

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## RECHERCHES SUR LA PHYSIOLOGIE D'UNE ALGUE VERTE

PAR M. LE D<sup>r</sup> P.-G. CHARPENTIER

---

### INTRODUCTION

Une cellule verte, n'est pas obligée, pour vivre et se multiplier, de disloquer une molécule de matière organique plus ou moins complexe, comme le font les autres cellules vivantes; elle doit tout au contraire prendre son carbone au composé qui le renferme sous sa forme la plus dégradée, c'est-à-dire à l'anhydride carbonique. Il existe donc une différence des plus marquées entre la nutrition des plantes vertes et celle de toutes les autres, différence qui, du reste, apparaît plus profonde, à mesure que l'on connaît mieux le rôle du carbone dans les végétaux.

Il est évident que, toutes choses égales d'ailleurs, la plante se développera plus ou moins vite suivant la nature de son aliment carboné, et cette vitesse de multiplication peut déjà servir à apprécier la valeur de cet aliment. C'est sur cette considération que Raulin a fondé la méthode qu'il a suivie dans son travail sur l'*Aspergillus niger*<sup>1</sup>; mais cette méthode, qui

1. RAULIN, Etudes chimiques sur la végétation. *Ann. des Sc. nat.*, 1870.

donne de très bons résultats quand il s'agit de la nutrition minérale, est tout à fait insuffisante dans l'étude de la nutrition carbonée, parce qu'elle ne tient aucun compte de la quantité d'aliment qu'il faut dépenser pour obtenir un poids donné du végétal, et le rapport du poids de plante produit au poids d'aliment consommé, ou le rendement, a, en l'espèce, une très grande importance.

Cette notion du rendement n'étant pas encore suffisamment précise, je la remplacerai par une autre qui l'est beaucoup plus. Ce qu'il serait surtout intéressant de connaître, c'est la quantité de carbone qui est devenue partie intégrante des tissus, ou le carbone *construit*, eu égard à la quantité de carbone mise en œuvre pendant une certaine période de la vie de la plante. Si celle-ci avait la même composition élémentaire que son aliment, il est clair que le nombre mesurant le rendement représenterait en même temps le rapport de ces deux poids de carbone, et servirait par conséquent à apprécier le mode d'utilisation de cet élément. Mais, en général, la composition de la plante et celle de son aliment sont fort différentes, si bien que la valeur du rendement ne permet pas de se faire une idée exacte de la manière dont le carbone est utilisé. On peut y parvenir facilement en déterminant le rapport, dont je viens de parler, du poids du carbone construit au poids total du carbone qui a pénétré dans la plante, rapport que j'appellerai *coefficient d'utilisation du carbone*.

Le poids du carbone D qui est entré dans les cellules du végétal a servi à deux fins : une partie C est construite, l'autre a été dépensée, soit pour fournir à la plante l'énergie dont elle a eu besoin pour faire ses tissus, c'est  $E_p$ , soit pour entretenir la vie des cellules déjà formées, c'est  $E_e$ . En sorte qu'à chaque instant on peut écrire :

$$D = C + E_p + E_e.$$

La somme  $C + E_p$  est ce que M. Duclaux<sup>1</sup> appelle la *dépense de construction*,  $E_e$  étant la *dépense d'entretien*.  $E_p + E_e$  est le carbone excrété par la plante, que l'on peut désigner par E; l'égalité précédente peut donc s'écrire :

$$D = C + E$$

$$\frac{C}{D} = 1 - \frac{E}{D}$$

D'où :

1. DUCLAUX, *Traité de microb.* I, p. 197.



Le coefficient d'utilisation du carbone, toujours plus petit que l'unité, s'en écartera d'autant moins que E sera plus petit relativement à D, c'est-à-dire que la quantité de carbone excrétée sera plus faible relativement à celle mise en œuvre, ce qui était évident *à priori*. Il varie comme le rendement, en ayant une signification plus précise.

Ceci posé, il est aisé de comprendre à quel point la vie des plantes vertes diffère de celle de toutes les autres.

Celles-ci prennent exclusivement leur carbone au substratum sur lequel elles reposent, et, si cet élément leur est offert sous la forme préférée, sous celle de sucre, le rendement ne dépasse guère  $\frac{1}{3}$  ; il faut trois parties de sucre pour faire une partie de plante (là au moins où des mesures exactes ont été faites, comme dans le cas de la levure et de quelques mucédinées<sup>1</sup>). Le coefficient d'utilisation du carbone est alors voisin de 0,40 ; environ 60 0/0 du carbone mis en œuvre ne font que traverser les tissus de la plante et subissent en grande partie une combustion complète, pour produire l'énergie nécessaire aux réactions chimiques dont le protoplasma est le siège. La lumière joue d'ordinaire un rôle très effacé dans la vie de ces végétaux ; elle peut sans inconvénient faire défaut la plus grande partie du temps. J'ajoute qu'en général l'ammoniaque est une excellente source d'azote, sinon la meilleure.

Il en va tout autrement pour les plantes vertes. Elles prennent normalement leur carbone dans l'atmosphère, et le coefficient d'utilisation du carbone a une valeur très élevée ; je ne connais aucune expérience qui permette de le calculer exactement ; une seule, faite par M. Th. Schlöesing<sup>2</sup> pour établir le bilan du carbone dans le développement de la Houque laineuse, donne à penser que ce coefficient doit être très voisin de l'unité<sup>3</sup>, la presque totalité du carbone qui pénètre dans la plante est construite, ce qui se conçoit étant donnée la faible quantité d'anhydride carbonique qu'exhalent les plantes vertes. Celles-ci, ne pouvant se procurer d'énergie en brûlant du carbone, s'en procurent autrement, elles en prennent à la lumière solaire, qui devient

1. DUCLAUX, *Traité de microb.* I, p. 196.

2. TH. SCHLÖESING, *Ann. Inst. Past.*, t. VII, 1893, p. 28.

3. Cette expérience ne permet pas une conclusion absolument rigoureuse, parce que la Houque a été cultivée en atmosphère confinée. Je ferai voir plus loin, p. 387, que la vie d'une plante verte à l'air libre ne peut être comparée à celle de la même plante maintenue à l'obscurité qu'avec beaucoup de réserves.

de ce fait absolument nécessaire au fonctionnement régulier de leurs organes.

Je viens de supposer, implicitement il est vrai, que les plantes pourvues de chlorophylle ne peuvent pas prendre de carbone directement aux matières organiques du sol, c'est-à-dire sans qu'il soit gazéifié au préalable. En est-il réellement ainsi? Il ne semble pas que la question ait été posée nettement avant Liebig<sup>1</sup>, qui la résolut par la négative; Boussingault conclut dans le même sens, car, dit-il: « J'admets que la totalité du carbone, assimilé par les plantes, a le gaz carbonique pour origine, parce que je ne connais pas une observation assez nette et assez complète pour établir que les matières carbonées renfermées dans le sol, les acides bruns par exemple, leur fournissent directement du carbone<sup>2</sup>. » Plus récemment M. Duclaux<sup>3</sup> a montré que ni les haricots, ni les pois ne pouvaient pendant la germination attaquer la caséine, le lactose, le saccharose ou l'amidon cuit. J. Laurent<sup>4</sup>, au contraire, a conclu de cultures faites à la lumière, que le maïs peut prendre par ses racines du carbone au glucose et au sucre interverti, mais les expériences faites en présence de l'anhydride carbonique de l'air manquent de précision. Enfin, suivant M. Mazé<sup>5</sup>, le maïs peut à l'obscurité assimiler de faibles quantités de glucose. En somme, dans l'état actuel de la science, on peut dire que si les plantes vertes prennent du carbone aux matières organiques du sol, elles ne le font que difficilement et pour de faibles quantités, à l'état normal bien entendu.

On sait que les végétaux à chlorophylle consomment très aisément l'azote nitrique, tandis qu'ils n'assimilent l'azote ammoniacal que sous certaines réserves<sup>6</sup>.

Ainsi, tant au point de vue de la nature de l'aliment carboné et de son utilisation, qu'à celui de la nature de l'aliment azoté et du rôle de la lumière, les plantes vertes diffèrent grandement de toutes les autres. Ce que j'ai rappelé suffit amplement à faire préjuger quelles dissemblances peuvent exister dans le détail des phénomènes vitaux.

1. LIEBIG, *Chimie appliq. à l'agricult.*

2. BOUSSINGAULT, *Chim. agric.*, t. IV.

3. DUCLAUX, *C. R.* 1883, C, p. 66.

4. J. LAURENT, *C. R.*, t. CXXVII, p. 786.

5. MAZÉ, *C. R.* 1899, CXXVIII, p. 185.

6. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, t. XIV, 1900, p. 26.



J'ai jusqu'ici exposé les faits tels qu'on les envisage ordinairement; cette manière de voir est-elle légitime? la présence de la chlorophylle entraîne-t-elle nécessairement dans la vie de la plante les changements que j'ai signalés? On connaît déjà des microbes dépourvus de pigment, qui peuvent assimiler le carbone de l'atmosphère; existe-t-il en revanche des végétaux verts capables de consommer le carbone des matières organiques à la manière des mucédinées, sur la vie desquelles, par conséquent, la lumière aurait peu d'influence?

Il est évident d'ailleurs que, possédant de la chlorophylle, ils pourraient, convenablement éclairés, prendre aussi du carbone à l'anhydride carbonique.

En établissant l'existence de telles plantes, je me propose de montrer qu'une des barrières que l'esprit avait élevées, à bon droit semblait-il, entre deux groupes de végétaux n'a pas plus de raison d'être que bien d'autres, qui ont dû tour à tour être renversées. La physiologie se prête encore moins que la morphologie à la classification des êtres.

On connaît, il est vrai, des plantes vertes, qui, exposées à la lumière, sont loin de prendre tout leur carbone à l'atmosphère; M. Bonnier<sup>4</sup> a constaté que chez le gui, le *thesium humifusum*, et plusieurs genres de scrofularinées, l'assimilation chlorophyllienne est moins active qu'elle le devrait; encore très notable chez le gui et les *melampyrum*s, elle est plus faible dans les *rhinanthus* et les *pédicularis*, pour devenir presque nulle dans les *euphrasias*; mais toutes ces plantes sont parasites et comme telles plus ou moins dégradées, car la fonction chlorophyllienne subit chez elles le même sort que subit dans des cas analogues la chlorophylle elle-même, qui, par exemple, peu abondante dans certaines espèces de *rhinanthus*, est absente dans l'*orobanche*.

Tous ces végétaux parasites ne répondent pas au but que je me suis proposé; en forçant un peu les choses on peut dire qu'une plante parasite n'est qu'un membre de son hôte et qu'il est impossible de séparer leurs fonctions, encore moins de conclure, des phénomènes qui s'y déroulent, ceux qui pourraient se passer dans une plante ordinaire.

4. BONNIER, *Comp. Rend.* 1891, CXIII, p. 1074.

Ce sont des plantes normales, vivant d'une vie autonome, que j'ai voulu étudier.

Dans la première partie de ce mémoire, je m'occuperai de la recherche et de la culture du végétal, dans la seconde de sa nutrition carbonée.

Je veux dire ici toute ma gratitude à mes maîtres : M. Duclaux, qui a pris la peine de suivre pas à pas dès l'origine toutes mes expériences, les critiquer et m'encourager sans cesse de ses conseils ; M. Roux, à qui je dois toutes mes connaissances bactériologiques ; M. G. Bonnier qui fut mon maître à la Faculté des Sciences et m'a toujours montré la plus grande bienveillance. M. Schlœsing fils a bien voulu m'initier à ses délicates méthodes d'études des gaz, je ne saurais l'en trop remercier ; M. Matruhot en botanique, M. G. Bertrand en chimie m'ont bien souvent donné des avis fort utiles, je leur en reste bien reconnaissant.

---



## PREMIÈRE PARTIE

## Généralités sur la plante.

## I

## RECHERCHE ET ISOLEMENT DE LA PLANTE

La plante cherchée doit satisfaire aux deux *desiderata* suivants :

1° Il faut pouvoir faire avec précision l'histoire de ses relations avec son substratum et avec l'atmosphère, et pour cela éliminer, avec le plus grand soin, pendant la durée de l'expérience, tout phénomène latéral dont le résultat ne peut être exactement mesuré; l'ingérence des infiniment petits, en particulier, doit être scrupuleusement évitée; la plante doit être *cultivée à l'état pur*, bactériologiquement parlant.

2° Il faut que la plante contienne de la chlorophylle et néanmoins vive de préférence comme une mucédinée aux dépens de matières organiques.

C'est parmi les végétaux verts les plus inférieurs, n'ayant pas de tissus bien différenciés, que j'avais le plus de chances de trouver un être chez lequel la chlorophylle ne jouerait pas un rôle capital; aussi ai-je conduit mes recherches dans le groupe des algues qui forment une couche verte sur le terreau, l'écorce des arbres, m'adressant de préférence aux unicellulaires, qu'il est plus aisé de cultiver à l'état de pureté.

J'ai isolé la plante comme on isole un microbe.

La solution minérale suivante :

Sulfate de magnésium.....	4	gramme.
Phosphate-bipotassique.....	2	grammes
Nitrate de calcium.....	2	—
Saccharose.....	10	—
Eau.....	1.000	—

solidifiée par la gélose, m'a servi de milieu nutritif, — il faut avoir soin de chauffer séparément la solution saline et une solution de gélose pour éviter la saccharification de celle-ci et la

perte de son pouvoir gélatinisant, que produit le chauffage à 120° en présence du phosphate bipotassique.

J'ai ensemencé en stries des fragments de terre, recouverts d'une couche très abondante d'algues vertes. Au bout de 4 jours ont apparu de petites colonies vert émeraude, contenant à l'état pur les cellules d'une chlorophycée unicellulaire, que je pouvais désormais cultiver purement.

## II

### MORPHOLOGIE DE LA PLANTE

La plante est constituée par des cellules sphériques isolées les unes des autres; leur membrane est mince, le protoplasma granuleux, le pigment chlorophyllien n'est pas localisé dans des leucites de forme déterminée, il semble imprégner tout le protoplasma.

J'ai observé quelquefois des cellules en train de bourgeonner, mais très exceptionnellement; en général, pour se multiplier, la plante procède autrement. Lorsque la cellule est suffisamment grosse, son protoplasma subit 3 bipartitions successives, se transformant ainsi en 8 sphérules; la cellule prend alors l'aspect d'une mûre; puis la membrane se rompt, mettant en liberté les 8 petites sphères, qui vont peu à peu grossir et devenir elles-mêmes des cellules adultes, qui recommenceront le même cycle de développement. Dans les préparations microscopiques, les coques vides sont très visibles, à cause de leur différence de réfringence avec l'eau; elles sont des plus nettes si la préparation est colorée par les couleurs basiques d'aniline.

Les cellules peuvent encore contenir, dans certaines circonstances, que je préciserai plus tard, de gros grains d'amidon.

Cette plante, que M. Bornet a bien voulu examiner avec une complaisance dont je ne saurais trop le remercier, est identique au *Cystococcus humicola* de Nägeli; elle fait partie du groupe des Confervacées à thalle dissocié, qu'on a réunies sous le nom de Palmellacées.

Beyerinck<sup>1</sup> et Kossowitch<sup>2</sup> ont déjà chacun à leur tour cultivé cette algue à l'état de pureté.

1. BEYERINCK, *Bot. Zeit.*, 1890.

2. KOSSOWITCH, *Bot. Zeit.*, 1894.



## III

## MILIEUX DE CULTURE

Le *Cystococcus* pousse bien sur le milieu gélosé sur lequel je l'ai isolé; il forme une couche verte, très épaisse, d'aspect chagriné, qui a peu de tendance à s'étendre au delà de la strie d'ensemencement.

Le bouillon de haricots glucosé et gélosé, tel que l'a employé M. Mazé<sup>1</sup>, est aussi un très bon milieu de culture pour la plante.

Dans la plupart de mes expériences, j'ai dû, pour apprécier l'abondance de la culture, connaître exactement le poids de plante produit, et pour cela renoncer aux milieux solides, qui se prêtent mal à une semblable détermination, pour avoir recours aux milieux liquides.

La solution indiquée page 375, convient mal pour ces cultures, elle est trop riche en calcium; celui-ci se précipite à l'état amorphe ou cristallisé sous l'influence de la très faible augmentation d'alcalinité que le développement de l'algue amène dans le milieu. Or, avant de peser la récolte, il faudrait éliminer ce phosphate qui est recueilli avec la plante; il est plus simple d'éviter sa formation en employant la solution suivante :

Sulfate de magnésium .....	1 gramme.
Phosphate bipotassique .....	2 grammes.
Nitrate de potassium.....	2 —
Nitrate de calcium.....	0 <sup>gr</sup> ,05.
Sulfate ferreux.....	traces
Eau.....	1000 grammes.

à laquelle on ajoute du glucose. La réaction de ce dernier milieu est celle du phosphate bipotassique, c'est-à-dire neutre à la phtaléine et à l'orangé et légèrement alcaline à l'alizarine sulfocconjuguée; aussi le chauffage à 120° a-t-il pour effet de précipiter une partie des sels dissous, notamment le fer et le calcium; il en reste néanmoins suffisamment en solution pour satisfaire aux besoins de la plante, parce que la présence du sucre empêche une précipitation totale.

Existe-t-il pour le *Cystococcus* un meilleur milieu de culture que celui que je viens d'indiquer, ou celui-ci est-il pour

1. MAZÉ, *Annal. Inst. Past.*, 1897, n° 1.

l'algue ce qu'est le milieu Raulin pour l'*Aspergillus*? Il est impossible de savoir ce qu'il en est, bien que les cultures obtenues se développent très abondamment et rapidement; tout ce que je puis dire, c'est que dans le milieu en question, la plante pousse assez bien pour permettre de réaliser les expériences que nécessite ce travail.

Dans les milieux liquides, le *Cystococcus* vit sur le fond du vase, où il forme une couche plus ou moins dense, laissant le liquide surnageant absolument limpide. La récolte est d'autant plus abondante que l'air a un plus large accès auprès des cellules, et, par suite, que le liquide est réparti en couche plus mince dans les vases de culture.

La plante se multiplie très bien à 28°, la lumière diffuse lui est favorable; les rayons directs du soleil, s'ils ne la tuent pas toujours, lui nuisent beaucoup.

#### IV

##### PESÉE DE LA RÉCOLTE

Pour séparer la plante du liquide de culture, on ne peut guère employer la filtration sur papier; les pores du filtre s'obstruent très rapidement, l'opération devient interminable. Il est bien plus avantageux de mettre la culture dans un tube et de la soumettre à l'action de la force centrifuge. Quand la vitesse de rotation est suffisante, l'opération est achevée en quelques minutes, toute la plante est rassemblée au fond du tube, laissant le liquide tout à fait limpide et facile à décanter.

La récolte, mise dans un verre de montre taré, est desséchée dans le vide sec pendant quelques heures et la dessiccation est achevée dans l'étuve à 105°.

L'augmentation de poids du verre de montre donne le poids sec de l'algue avec toute la précision désirable.



## DEUXIÈME PARTIE

## Assimilation du carbone.

Pour mettre en lumière les caractères saillants de l'assimilation du carbone par le *Cystococcus*, j'étudierai avec grand soin la vie de l'algue aux dépens du glucose, qui est extrêmement fréquent dans les tissus végétaux, et qui est d'ailleurs un excellent aliment pour toutes les plantes inférieures. Je m'occuperai ensuite de l'assimilation de quelques autres sucres, qui présentera des particularités intéressantes, et permettra de se faire une idée de la synthèse des hydrates de carbone dont la cellule est le siège.

## I

## ASSIMILATION DU GLUCOSE

Le développement rapide et abondant de la plante dans le milieu dont j'ai indiqué la composition page 377, fait bien pressentir qu'elle assimile le glucose, mais, comme l'accès de l'anhydride carbonique de l'air n'a pas été évité, la conclusion manque de rigueur, il faut recommencer l'expérience dans de nouvelles conditions.

Dans une fiole plate, dite boîte à culture de M. Roux, je mets 100 c. c. de la solution minérale indiquée page 377, additionnée de 10/0 de glucose (la couche liquide n'a pas plus de 3 à 4 millimètres d'épaisseur); après stérilisation, la fiole estensemencée, puis fermée par un bouchon traversé par 2 tubes de verre; pendant toute la durée de la culture, qui se fait à 28°, à la lumière diffuse, un courant d'air complètement dépouillé d'anhydride carbonique passe sur la surface du liquide, entrant par l'un des tubes de verre et sortant par l'autre. Au bout de 44 jours la récolte est très abondante, son poids s'élève à 400 milligrammes, et 642 milligrammes de sucre ont disparu du milieu.

Ainsi, en même temps que ce dernier s'appauvissait en sucre, la plante se multipliait très rapidement; elle a donc certainement consommé le glucose, dont le carbone doit se trouver partiellement dans les cellules<sup>1</sup>.

1. Ce résultat est en opposition avec celui énoncé par Kossowitch dans son mémoire sur la fixation de l'azote (*Bot. Zeit.*, 1894); mais il confirme ceux obtenus 6 ans auparavant par Beyerinck (*Bot. Zeit.*, 1890).

Peut-être eût-il semblé plus naturel, au premier abord, pour s'assurer de l'assimilation effective du glucose, de supprimer la fonction chlorophyllienne en cultivant le *Cystococcus* à l'obscurité? Si je ne l'ai pas fait, c'est que j'ai tenu, pour établir un point aussi important, à mettre la plante dans les conditions de vie les plus normales. La lumière est aussi indispensable aux végétaux verts que la chaleur et l'humidité; en supprime-t-on l'accès, ceux-ci même nourris de sucre, s'étiolent, leurs tissus se gorgent d'eau<sup>1</sup>, ils perdent toute ressemblance avec des végétaux normaux; la fonction chlorophyllienne est totalement supprimée, il est vrai, mais toutes les autres sont ralenties, la réduction des nitrates, par exemple, est très entravée<sup>2</sup>. Une plante verte, maintenue à l'obscurité, est un être malade.

Le *Cystococcus* obtenu dans l'expérience ci-dessus, à la lumière et aux dépens du glucose, est très vert; les cellules sont en majorité petites, leur membrane est mince; le liquide de culture contient beaucoup de coques vides de vieilles cellules.

L'algue peut prendre son carbone au glucose, mais par quel mécanisme le fait-elle?

Assimile-t-elle ce sucre sans l'aide de sa chlorophylle, c'est-à-dire en brûlant une partie pour organiser l'autre? le brûle-t-elle au contraire complètement pour ne prendre son carbone qu'à l'anhydride carbonique (la mise en marche se faisant, dans cette hypothèse, au moyen des matières de réserve contenues dans les cellulesensemencées)? ou bien la vie de la plante tient-elle à la fois des deux manières d'être que je viens d'indiquer?

C'est à l'expérience à prononcer.

*Le Cystococcus peut se passer de l'aide de sa chlorophylle pour prendre du carbone au glucose.*

Pour le prouver, j'ai fait 4 cultures identiques à celles de la page 379, mais 2 d'entre elles étaient exposées à la lumière diffuse et les deux autres maintenues à l'obscurité — les vases de culture étaient entourés de plusieurs enveloppes de papier noir opaque; — un courant d'air purgé d'anhydride carbonique passait constamment sur la surface du liquide des deux premières,

1. Mazé, *Comp. rend.* 1899, c. XXVIII, p. 189.

2. Pagnoul, *Ann. agron.*, 1879, t. V.



précaution naturellement inutile pour les deux autres. Voici les résultats obtenus :

TABLEAU I

Conditions d'éclairement	Durée de la culture en jours	Poids sec de la récolte en mg.
A la lumière	44	400
A l'obscurité	—	27
A la lumière	18	378
A l'obscurité	23	273

Ces chiffres montrent que le *Cystococcus* peut parfaitement se développer à l'obscurité aux dépens du sucre, c'est-à-dire dans des conditions où sa chlorophylle ne lui peut être d'aucun secours ; la multiplication est lente, il est vrai, puisqu'en 44 jours il ne s'est fait que 27 milligrammes de plante contre 400 produits à la lumière, mais le développement suit une marche régulière qu'attestent les 273 milligrammes de plante récoltés en 3 semaines à l'obscurité. Je ferai cependant remarquer que les cellules qui n'ont pas subi l'influence des rayons lumineux contiennent beaucoup de substances de réserve, qui, n'étant pas organisées, ne devraient pas compter dans le poids de la récolte ; les chiffres obtenus pour les cultures faites à l'obscurité sont donc en réalité trop forts, mais ils indiquent le sens du phénomène, c'est tout ce que nous pouvons leur demander pour le moment ; je reviendrai du reste plus loin sur cette question.

*Le Cystococcus peut, grâce à sa chlorophylle, prendre du carbone à l'anhydride carbonique.*

Ceci ressort de l'étude de la marche de 2 cultures faites en atmosphère confinée, l'une à la lumière, l'autre à l'obscurité.

*Expérience I* (à la lumière). — Dans un ballon à fond plat, suffisamment résistant pour que l'on puisse y faire le vide, je mets 50 c. c. de liquide de culture. Après stérilisation à 120°, le ballon estensemencé ; il est ensuite fermé par un bouchon de caoutchouc traversé par l'extrémité inférieure d'un tube de verre dont l'autre extrémité est munie d'un bout de caoutchouc à vide fermé lui-même par un morceau de baguette de verre. Le bouchon

en caoutchouc d'une part, le morceau de tube en caoutchouc de l'autre sont chacun noyés sous le mercure d'après le procédé indiqué par M. Schlœsing<sup>1</sup> pour éviter les fuites. Un tampon de coton mis dans le goulot du ballon, au-dessous du bouchon, empêche la pénétration des germes étrangers. Avant de mettre la culture en train il faut retirer avec la pompe à mercure un peu d'air du ballon, afin que la force élastique à l'intérieur soit inférieure à celle de l'atmosphère de 10 centimètres environ; cette diminution de pression est indispensable pour que les joints noyés sous le mercure assurent efficacement l'étanchéité de l'appareil. Cette extraction d'air et toutes les opérations effectuées sur les gaz du ballon sont faites suivant le mode opératoire indiqué par M. Schlœsing. Le ballon est enfin mis dans une serre dont la température est autant que possible maintenue aux environs de 28°.

Au bout de 25 jours le ballon est retiré de la serre, la récolte pèse 223 milligrammes, le liquide de culture ne contient plus trace de sucre. J'extrais complètement les gaz contenus dans le ballon, en le chauffant au bain-marie à 52°, et je les recueille dans le volumètre Schlœsing afin d'en mesurer le volume.

Voici les données numériques qui permettent de calculer ce volume :

H <sub>0</sub> hauteur barométrique ramenée à 0°.....	758 <sup>mm</sup> .2
h <sub>0</sub> différence des niveaux du mercure à 17°7 dans les 2 branches du volumètre, ramenée à 0° = 423,7 — 1,3 .....	422 <sup>mm</sup> .4
F <sub>0</sub> tension de la vapeur d'eau dans le gaz mesuré à 17°4 .....	14, 79
$h_0 + F_0 =$	$\frac{437, 2}{437, 2}$
H <sub>0</sub> — (h <sub>0</sub> + F <sub>0</sub> ) pression ramenée à 0° .....	321, 0
Capacité du volumètre = 1949,5 c.c.	

D'où, en employant la formule connue, on tire le volume V du gaz supposé sec à 0° et sous 760 millimètres.

$$V = 774, 1 \text{ c. c.}$$

Une analyse eudiométrique permet de connaître la composition du mélange gazeux.

En désignant par :

H, la hauteur barométrique ramenée à 0° ;

h, la différence des niveaux du mercure dans les 2 branches de l'eudiomètre ;

1. TH. SCHLÖESING, *Ann. Inst. Past.*, 1892.



$\theta$ , la température du mercure dans les 2 branches de l'eudiomètre :

$t$ , la température du gaz en expérience ;

F, la tension maxima de la vapeur d'eau à  $t^{\circ}$  ;

le tableau suivant résume les données de l'expérience :

TABLEAU II

	H	h	$\theta$	$h$ ramenée à 0°	$t$	F	H — (h + F) ramenée à 0°
Gaz à analyser	758,6	478,1	17°3	476,7	17°2	14,60	267,3
après l'action de la potasse	758,6	502,1	17°3	500,6	17°2	14,60	243,4
après l'addition d'hydrogène	758,6	251,5	17°5	250,7	17°3	14,70	493,1
après le passage de l'étincelle	758,7	398,8	17°6	397,6	17°4	14,79	346,3

Les proportions pour 100 d'anhydride carbonique et d'oxygène dans le mélange sont donc les suivantes :

$$\text{Anhydride carbonique} \quad \frac{267,3 - 243,4}{267,3} 100 = 8,9$$

$$\text{Oxygène} \quad \frac{1}{3} \frac{493,1 - 346,3}{267,3} 100 = 18,3$$

Je me suis en outre assuré, en ajoutant du gaz tonnant au gaz à analyser et en faisant passer l'étincelle, que le volume du gaz en expérience ne change pas ; le mélange ne contient donc pas de gaz combustible susceptible d'être brûlé par l'oxygène, et en particulier pas d'oxyde de carbone, le passage de l'étincelle ne déterminant pas la production d'anhydride carbonique. Le mélange gazeux est donc constitué exclusivement par de l'azote, de l'oxygène et de l'anhydride carbonique dans la proportion suivante :

CO <sub>2</sub>	8,9
O	18,3
Az	72,8
	<hr/> 100,0

Les 774,1 c. c. de gaz extraits du ballon ont donc la composition suivante :

CO <sup>2</sup>	68,9 c. c.
O	141,7
Az	563,5
	<hr/> 774,1

Si l'on admet, ce que j'ai du reste démontré dans un précédent mémoire<sup>1</sup>, que l'azote de l'atmosphère n'a pu être touché par la plante, et qu'il se retrouve à la fin de la culture tel qu'il était au début, le calcul montre que le ballon contenait, au moment où il a été mis dans la serre, 713,3 c. c. de gaz supposé mesuré sec et sous 760 millimètres de pression.

La plante en se développant a donc amené dans la composition du ballon des changements que résume le tableau III (dans lequel tous les nombres représentent des cent. cub.).

TABLEAU III.

	Début de la culture	Fin de la culture	Gains
CO <sup>2</sup>	0	68,9	68,9
O	149,8	141,7	-8,1
Az.	563,5	563,5	0
Totaux..	713,1	774,1	60,8

*Expérience II* (à l'obscurité). — Elle est conduite comme la précédente, mais le ballon de culture est complètement enveloppé de papier noir opaque. Au bout de 33 jours j'ai obtenu une récolte de 124 mgs. Les gaz contenus dans le ballon en ont été extraits, j'en ai mesuré le volume et déterminé la composition comme dans l'expérience précédente. Le tableau IV résume les changements que la culture a amenés dans l'atmosphère du ballon, (tous les nombres du tableau représentent des c. c.).

Les résultats des 2 expériences sont intéressants à plus d'un titre.

Tout d'abord il y a lieu d'être frappé d'un fait tout à fait imprévu que révèle l'expérience I. A l'inverse de ce que l'on pouvait croire, de ce qui se passe normalement chez les plantes vertes, le *Cystococcus*, vivant à la lumière, enrichit son atmosphère en anhydride carbonique et non en oxygène; il est vrai

1. P. G. CHARPENTIER. *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1903.



TABLEAU IV.

	Début de la culture	Fin de la culture	Gains
CO <sup>2</sup>	0	74, 2	74, 2
O	466	416, 6	— 49,4
Az	624, 8	624, 8	0
Totaux...	790, 8	815, 6	24, 8

qu'il assimile alors le carbone du glucose et non celui de CO<sup>2</sup>, mais ceci prouve simplement qu'il se comporte en apparence comme une mucédinée. Je puis même ajouter qu'il ne consomme pas l'anhydride carbonique dès qu'il est produit, puisqu'il le laisse se dégager, et préfère par conséquent prendre son carbone au glucose plutôt qu'à ce gaz.

La grande quantité d'anhydride carbonique dégagée dans l'expérience I prouve l'intensité de la respiration pendant la culture et correspond bien à la grande quantité de glucose consommée, soit 505 milligrammes <sup>1</sup> (il ne faut cependant pas perdre de vue que dans une atmosphère aussi riche en CO<sup>2</sup>, le *Cystococcus* a pu fabriquer de l'alcool aux dépens du sucre; une partie du gaz carbonique recueilli pourrait donc devoir son origine à cette fermentation); or il est manifeste que les 8,1 c. c. d'oxygène qui ont disparu de l'atmosphère du ballon n'ont pu suffire à de semblables combustions respiratoires, ni à l'édification de 223 mgs. de plante; il a fallu que l'oxygène soit consommé en beaucoup plus grande quantité; c'est du reste ce que prouve l'expérience II, dans laquelle ne se faisaient que 124 mgs. de plante tandis que 49,4 c. c. d'oxygène disparaissaient. Donc, dans

1. On ne peut doser les sucres réducteurs dans les liquides de culture par simple décoloration de la liqueur de Fehling, parce qu'il est impossible de saisir le moment exact où tout le cuivre est précipité : aussi ai-je toujours eu recours à la méthode de Lehmann, telle qu'elle a été modifiée par M. Maquenne. (*Bull. de la Soc. Chim.*, 1898, XIX.) Je rappelle qu'elle consiste à faire bouillir avec une quantité connue de liqueur de Fehling une quantité de liqueur sucrée insuffisante pour réduire la totalité du réactif; le cuivre non précipité est dosé par l'iode qu'il peut mettre en liberté dans une solution d'iodure de potassium, cet iode libre étant lui-même dosé par l'hyposulfite de soude.

l'expérience I, la plante a certainement dégagé de l'oxygène; ceci était d'ailleurs encore plus net dans une autre expérience tout à fait analogue, dans laquelle le ballon renfermait à la fin de la culture plus d'oxygène qu'au début.

L'algue a donc, sans aucun doute, décomposé par sa fonction chlorophyllienne une partie de l'anhydride carbonique produit par la respiration.

Au point où nous en sommes arrivés, nous sommes à même de dire que le *Cystococcus* peut d'une part consommer le glucose sans l'aide de sa chlorophylle, et d'une autre prendre, grâce à elle, du carbone à l'anhydride carbonique.

Le *Cystococcus* est donc bien la plante que je cherchais, elle est verte et cependant consomme le glucose comme une mucédinée; elle peut, il est vrai, assimiler le carbone de  $\text{CO}_2$ , mais cet aliment est loin de valoir le sucre pour elle.

La manière dont elle sait utiliser le glucose montre avec une grande évidence qu'elle est intermédiaire entre les plantes dépourvues de chlorophylle et celles qui en possèdent, tout en étant plus rapprochée des premières.

Des faits d'un autre ordre vont légitimer cette manière d'envisager les choses.

*Rendement et coefficient d'utilisation du carbone.*

J'ai expliqué dans l'introduction ce qu'il fallait entendre par le rendement d'une culture et le coefficient d'utilisation du carbone d'un aliment. Je crois cependant utile de revenir sur ces notions pour les considérer cette fois au point de vue de la plante qui nous occupe.

Je suppose d'abord que celle-ci vive sur un substratum contenant du carbone, dans une atmosphère dépouillée d'anhydride carbonique avant la mise en marche de la culture — ces conditions sont presque exactement celles dans lesquelles je mettrai le *Cystococcus*. — J'ai montré que, pour toute plante, entre le carbone absorbé, le carbone construit et le carbone excrété, il y avait la relation :

$$D = C + E$$

Le carbone construit C, qu'il provienne directement du substratum, ou indirectement par décomposition de l'anhydride



carbonique dû à la respiration, vient en fin de compte intégralement du carbone D.

Quant au carbone excrété, sous quelle forme se trouve-t-il? Existe-t-il dans le liquide de culture un ou plusieurs produits microbiens désormais inutiles à la plante? Il est impossible de le savoir, l'examen même le plus minutieux du liquide ne le saurait révéler, les coques vides des vieilles cellules du *Cystococcus* pouvant en se macérant enrichir le liquide en carbone; carbone qu'on ne devrait évidemment pas compter comme carbone excrété.

Dans le doute, j'envisagerai le cas le plus général, celui où le carbone excrété se trouve partie à l'état d'anhydride carbonique et par suite assimilable grâce à la chlorophylle, partie dans des produits organiques désormais inassimilables; en désignant par A le premier et I le second, je puis écrire :

$$E = A + I$$

L'égalité  $D = C + E$  devient alors :

$$D = C + A + I.$$

Ici les conditions de vie vont jouer un rôle très considérable. La plante est-elle cultivée dans un courant d'air entraînant à chaque instant l'anhydride carbonique produit? Le carbone A, est perdu pour la plante en presque totalité (est seule utilisée la petite fraction prise à l'anhydride carbonique avant sa sortie des cellules); dans ces conditions la vie du végétal se rapproche beaucoup de celle d'une plante sans chlorophylle.

Si au contraire la plante se développe dans une atmosphère confinée, rien n'empêche que tout le carbone A vienne petit à petit à faire partie intégrante de la cellule. Dans les mêmes conditions, mais en supposant la plante maintenue à l'obscurité, tout le carbone  $A + I$  serait évidemment inassimilable.

Les conditions de culture, jouant un très grand rôle dans l'utilisation de la matière alimentaire, influenceront beaucoup sur la valeur du rendement et sur celle du coefficient d'utilisation du carbone. Celles-ci, toujours inférieures à l'unité, seront d'autant plus grandes que l'aération de la culture sera moins complète.

Si donc la plante vit à l'air libre et à la lumière, le poids de plante produit aux dépens d'un poids donné de carbone sera déterminé uniquement par les conditions d'aération, le rendement et le coefficient d'utilisation du carbone ayant dans ce cas

une valeur bien déterminée; s'il s'agit au contraire d'une culture en atmosphère confinée, au bout d'un temps suffisamment long presque tout le carbone de l'aliment fera partie des tissus de la plante, le rendement et à plus forte raison le coefficient d'utilisation du carbone n'auront plus alors aucun sens.

On conçoit du reste qu'entre ces deux extrêmes tous les intermédiaires puissent trouver place : je montrerai d'ailleurs que si une vie purement aérobie est impossible à procurer à une plante même verte, vivant sous une couche liquide en brûlant de la matière organique, par contre une telle plante maintenue dans une atmosphère confinée peut, dans la première partie de son existence, être considérée comme ayant à sa disposition tout l'oxygène qui lui est nécessaire.

Le rendement d'une culture, le coefficient d'utilisation du carbone d'une substance, n'ont, nous venons de le voir, aucune signification par eux-mêmes, quand il s'agit d'une plante verte; ils n'en prennent une que quand les conditions dans lesquelles on les détermine sont bien précisées; mais, même alors, ce n'est pas la valeur absolue des nombres qu'il faut considérer, parce qu'elle n'a aucun sens, mais leur valeur relative. C'est la comparaison des chiffres obtenus dans 2 cultures dont toutes les conditions sont identiques sauf une, qui peut nous apprendre quelque chose de nouveau.

Pour calculer le rendement d'une culture faite sur glucose, je me suis placé dans les conditions suivantes : j'ai mis 100 c. c. de liquide nutritif dans une boîte de M. Roux; je l'aiensemencé puis mis à l'étuve à la lumière diffuse et à une température de 28°. Dans ces conditions d'aération (déterminées par l'épaisseur de la couche liquide dans le vase de culture), de lumière et de température, j'ai au bout de 13 jours recueilli 490 milligrammes de plante, tandis que 914 milligrammes de sucre avaient disparu. Le rendement a donc été :

$$R = \frac{490}{914} = 0,54.$$

Ce nombre dépasse 1/2; or, dans les cultures de levure ou d'aspergillus faites dans les conditions les plus favorables, le rendement est toujours voisin de 1/3, il est donc notablement plus considérable dans le cas du *Cystococcus* — dans certaines cultures il s'est même élevé jusqu'à 2/3.



Quant au coefficient d'utilisation du carbone, il est facile de le calculer sachant que le glucose contient 40 0/0 de son poids de carbone et la plante 49 0/0, ainsi que je l'ai reconnu par l'analyse élémentaire; ce coefficient Q a la valeur suivante :

$$Q = 0,65.$$

Ce nombre est notablement inférieur à l'unité; il ne faut pas s'en étonner, cela tient à ce que le glucose favorise beaucoup la multiplication du végétal. En effet, si, en consommant un aliment donné, le *Cystococcus* ne se développe pas rapidement, toutes les fonctions de la vie, la respiration entre autres, sont peu actives, l'anhydride carbonique n'étant produit que lentement peut être presque intégralement repris par la fonction chlorophyllienne au fur et à mesure de sa production; dans ce cas, tout le carbone de l'aliment se retrouve, ou à très peu près, dans les tissus de la plante, et le coefficient d'utilisation du carbone ne diffère que fort peu de l'unité. La conclusion inverse s'impose, si l'aliment convient bien à la vie des cellules; c'est ce qui se passe pour le glucose.

Le nombre 0,65, trouvé pour le *Cystococcus*, est très notablement plus élevé que celui de 0,40, que j'ai indiqué page 371, comme caractérisant les cultures des plantes sans chlorophylle, mais il est moindre que ceux, très voisins de l'unité, que l'on observe dans le développement des plantes supérieures.

Nous sommes donc amené, à conclure encore que le *Cystococcus* est une plante verte qui tient le milieu entre les végétaux pourvus de chlorophylle et ceux qui n'en ont pas.

J'ai montré que l'algue pouvait prendre son carbone au glucose directement en le brûlant comme une mucédinée, et indirectement en décomposant l'anhydride carbonique produit par la respiration; elle a en somme deux sources de carbone, là où une mucédinée n'en a qu'une. Il est donc tout naturel de voir dans la présence de la chlorophylle une des raisons pour lesquelles le rendement, le coefficient d'utilisation du carbone atteignent des valeurs si élevées; nous en trouverons une autre en étudiant le rôle de la lumière dans la vie de la plante.

#### *Amylogénèse.*

Les cellules développées à l'air libre et à la lumière, traitées

par l'iode, ne présentent aucun corpuscule coloré en bleu foncé, elles ne contiennent donc pas d'amidon<sup>1</sup>, elles prennent cependant une très légère teinte bleue uniforme qui parfois tire sur le violet. En faut-il conclure que la cellule, sans contenir d'amidon concrété en grains, renferme cependant des dérivés de l'amidon, amidon soluble, dextrine, etc...? Je ne l'oserais pas, si d'autres expériences ne devaient m'en donner plus loin des preuves plus positives que ces légères colorations.

Ce qu'il est permis d'affirmer, c'est que, vivant en milieu liquide à la lumière, aux dépens du glucose, la plante ne fabrique pas de grains d'amidon; ses cellules sont cependant capables d'en faire, tout dépend des circonstances dans lesquelles elles se trouvent comme nous le verrons.

#### *Influence de l'oxygène de l'air.*

J'ai déjà dit (p. 378) que, pour obtenir une récolte abondante, le liquide nutritif devait être en couche mince dans les vases de culture. Il peut au premier abord paraître surprenant que la question d'aération puisse jouer un rôle dans la culture d'une plante verte, que l'on serait en droit de supposer dégageant de l'oxygène à la lumière comme toutes les autres plantes chlorophylliennes. Mais j'ai fait voir que le *Cystococcus* ne se comportait pas comme une plante verte ordinaire, et, en précisant les rapports de l'algue avec l'atmosphère ambiante, j'apporterai de nouvelles preuves à l'appui de ce que j'ai avancé.

Pour cela le mieux est d'étudier la marche d'une culture en atmosphère confinée.

A quelque moment que j'aie arrêté une telle culture, je n'ai jamais trouvé dans le mélange gazeux extrait du ballon plus de 9 0/0 d'anhydride carbonique; cela tient à ce que la plante ne pousse pas à la surface du liquide et que l'anhydride carbonique est beaucoup plus soluble dans l'eau que l'oxygène.

Dans l'expérience citée p. 381, la composition de l'atmosphère du ballon était à la fin de la culture la suivante :

1. Pour rechercher l'amidon dans les cellules, voici la méthode que j'ai suivie : la préparation fixée sur lame est traitée par une solution aqueuse de chloral (hydrate de chloral 3, eau 2) (Detmer), qui dissout la chlorophylle : le chloral est ensuite enlevé par l'alcool absolu, puis celui-ci par l'eau : la préparation est alors traitée par la solution iodo-iodurée de Gram, puis lavée à l'eau; s'il y a surecoloration jaune des tissus, un lavage à l'alcool, suivi d'un lavage à l'eau, la fait disparaître.



CO <sup>2</sup>	8,9
O	18,3
Az	72,8
	<hr/> 100,0

Connaissant les coefficients de solubilité des 3 gaz dans l'eau, il est aisé d'en déduire en quelle proportion chacun d'eux est dissous dans le liquide de culture ; le calcul donne les nombres qui suivent :

CO <sup>2</sup>	86,35
O	5,85
Az	7,8
	<hr/> 100,00

Or, au début de la culture, les quantités des gaz dissous étaient fort différentes :

CO <sup>2</sup>	2
O	32,5
Az	65,5
	<hr/> 100,0

Le liquide contenait alors beaucoup d'oxygène et peu d'anhydride carbonique ; la plante en vivant et se multipliant l'enrichit en gaz carbonique en même temps qu'elle l'appauvrit en oxygène.

La plante se tient sur le fond du vase, c'est-à-dire au-dessous de la couche liquide, elle ne peut donc prendre d'oxygène qu'aux gaz dissous (l'oxygène des sels ne pouvant évidemment jouer qu'un rôle fort effacé), elle n'en a donc que fort peu à sa disposition à la fin de la culture. L'atmosphère du ballon ne contient jamais plus de 90/0 d'anhydride carbonique, parce que dans ces conditions l'algue ne trouve plus assez d'oxygène pour brûler le glucose, et doit régler la consommation du sucre sur la quantité de gaz qu'elle dégage par sa fonction chlorophyllienne.

Il est donc légitime de supposer que le mode de nutrition du *Cystococcus* en atmosphère confinée subit avec le temps des changements profonds.

Au début, l'oxygène étant abondant, l'algue consomme très activement le glucose ; sa fonction chlorophyllienne ne lui permet alors de décomposer qu'une très minime fraction de l'anhydride carbonique produit, le reste se dégage et s'accumule peu à peu dans l'atmosphère. Le moment vient bientôt où, cette atmosphère renfermant 8 à 90/0 de gaz carbonique, la plante manque d'oxygène : elle en met alors en liberté d'une manière

active et l'emploie à brûler le glucose restant ; pendant toute cette période, le taux d'anhydride carbonique se maintient à peu près constant dans le ballon. Enfin le liquide ne contient plus de glucose, le *Cystococcus* n'a qu'une ressource, c'est de décomposer le reste de l'anhydride carbonique qu'il a dégagé. J'ai constaté que les choses se passaient effectivement ainsi ; à la fin d'une expérience qui a duré 7 semaines, l'atmosphère du ballon ne renfermait plus que 0,6 0/0 de gaz carbonique.

L'algue se comporte donc comme une mucédinée, ou bien peu s'en faut, au commencement de la culture, et comme une plante verte à la fin ; elle passe insensiblement d'un de ces deux modes de vie à l'autre. L'étude de son développement en atmosphère confinée fait donc ressortir de la façon la plus nette ses caractères d'être de transition.

Il est possible de concevoir maintenant quelle avidité doit avoir pour l'oxygène la plante nourrie de sucre ; ni le glucose, ni les sels minéraux, ni l'eau, ne lui en peuvent fournir une quantité suffisante, l'atmosphère seule le peut, une expérience va le prouver.

Je fais 2 cultures simultanées, chacune dans 100 c. c. de liquide, l'une dans un vase à fond plat très large, où le liquide est en très faible épaisseur, l'autre dans un petit ballon complètement rempli ; le vase à fond plat est constamment traversé par un lent courant d'air, dépouillé par la potasse de toute trace d'anhydride carbonique. Au bout de 11 jours, j'ai recueilli 400 milligrammes de plante dans la première culture et seulement 55 dans la seconde. L'influence de l'aération est indéniable.

Dans le ballon complètement rempli la culture se continue très lente, jusqu'à complet épuisement du sucre ; l'anhydride carbonique, produit en très petite quantité à la fois, est en grande partie repris par la fonction chlorophyllienne, aussi le rendement est-il très bon ; il peut atteindre au début 75 0/0 du poids du sucre disparu ; il devient par la suite de moins en moins élevé, parce que, comme nous le verrons plus loin, le glucose disparaît sous forme d'alcool et d'anhydride carbonique, tandis que le poids de la plante reste stationnaire.

De tous les faits que je viens d'établir, il résulte :

1° Que, pour obtenir une récolte abondante, il faut mettre le

liquide en couche mince dans le vase de culture, ainsi que je l'ai avancé p. 378.

2<sup>o</sup> Que la plante préfère le glucose à l'anhydride carbonique comme source de glucose, ce qui n'est qu'une nouvelle confirmation d'une chose déjà établie, page 385.

### *Influence de l'éclairement.*

1<sup>o</sup> *Production de chlorophylle à l'obscurité.* — Si, à beaucoup de points de vue, les cellules maintenues à l'obscurité diffèrent de celles qui ont été exposées à la lumière, elles leur ressemblent par leur couleur. Le *Cystococcus*, en effet, n'a pas besoin, comme les végétaux supérieurs, de radiations lumineuses pour faire de la chlorophylle.

Ce fait très intéressant n'est pas neuf dans la science. Je rappelle d'abord, pour mémoire, que les pousses étiolées de conifères, de fougères, de gui, peuvent verdir dans l'obscurité absolue. Mais ce qui est l'exception chez les végétaux supérieurs semble être la règle chez les algues très inférieures.

Bouillhac <sup>1</sup> a montré le premier que le nostoc punctiforme, cultivé à 30° dans des liquides glucosés, était capable de faire de la chlorophylle, quand on le maintenait à l'obscurité.

Artari <sup>2</sup> a pu observer la même chose sur les gonidies de lichens (*chroococcum*, *xanthorica*).

Radais <sup>3</sup> a cultivé à l'état de pureté la *chlorella vulgaris* sur de la pomme de terre et de l'extrait de malt gélosé, et a reconnu que les cultures se font aussi bien et sont aussi vertes à l'obscurité qu'à la lumière; le pigment vert est bien de la chlorophylle, le spectre de sa solution alcoolique en possède les bandes d'absorption.

Enfin Matruchot et Molliard <sup>4</sup> ont obtenu des cultures pures de *stichococcus bacillaris*, et constaté que la plante pousse verte à l'obscurité.

J'ai pu observer la même chose sur le *Cystococcus*, mais la teinte verte de l'algue, développée à l'obscurité, est un peu

1. BOUILLHAC, *Thèse* de Paris, 1898.

ETARD et BOUILLHAC, *Comp. rend.*, 1898.

2. ARTARI, *Bull. de la Soc. Imp. des Natur. de Moscou*, 1899, n° 1, p. 33.

3. RADAIS, *Comp. rend.*, 1900, CXXV, p. 795.

4. MATRUCHOT et MOLLIARD, *Rev. gén. de bot.*, XIV, 1902, p. 193.



jaune et n'a pas l'intensité de coloration de la plante qui a vu la lumière. Il se peut que la présence de grandes quantités d'amidon dans les cellules, qui n'ont pas été éclairées, fasse paraître leur couleur plus pâle; dans un cas comme dans l'autre le pigment est bien de la chlorophylle, je m'en suis assuré par l'analyse spectrale.

Il est clair qu'à l'obscurité la chlorophylle n'est d'aucune utilité à la plante pour l'assimilation du carbone, elle semble n'être qu'un pigment dont l'utilité nous échappe, comme ceux qui existent dans beaucoup de microbes. La production de chlorophylle à l'obscurité conduit à éloigner le *Cystococcus* des plantes vertes supérieures, pour le rapprocher des mucédinées et autres végétaux sans chlorophylle.

2° *Abondance des récoltes.* — Le *Cystococcus* se développe beaucoup plus lentement à l'obscurité qu'à la lumière; 2 cultures, faites dans des conditions identiques, mais dont l'une était éclairée et l'autre non, ont donné des récoltes dont les poids étaient entre eux comme 400 et 27. L'absence de lumière, qui retarde la multiplication des cellules, ne l'empêche cependant pas complètement, car en 33 jours, j'ai pu recueillir à l'obscurité 275 milligrammes de plante.

3° *Aspect des cellules et amylogénèse.* — Les cellules, qui sont nées et ont grandi sans voir la lumière, n'ont pas le même aspect que les autres; elles sont beaucoup plus grosses et leur membrane est très épaisse, ce qui leur donne le facies de cellules en vie ralentie.

De plus, et c'est là le point le plus intéressant, elles sont bourrées de gros grains d'amidon parfaitement visibles à un simple examen microscopique sans aucune coloration, et qui après l'action de l'iode se montrent colorés en noir.

Le *Cystococcus* peut donc aux dépens du glucose fabriquer de l'amidon à l'abri des radiations lumineuses, j'ai montré qu'il ne le faisait pas quand il est éclairé. Au premier abord il semble donc se différencier nettement des plantes supérieures, qui peuvent faire la synthèse de l'amidon soit à la lumière, en prenant du carbone à l'anhydride carbonique, soit à l'obscurité en consommant des hydrates de carbone variés<sup>1</sup>.

1. SACHS, SCHIMPER, BOKORNY.

Cette différence n'est cependant qu'apparente et ne tient aucunement à la nature des végétaux.

Ce n'est pas la lumière qui empêche les cellules du *Cystococcus* de fabriquer des grains d'amidon, car si, dans une culture sur gélose, on examine les cellules qui font partie de la couche la plus superficielle d'une épaisse strie d'ensemencement, on est tout surpris d'en trouver un grand nombre renfermant de l'amidon. Il est probable que ces cellules, qui sont les plus éloignées du substratum nutritif, ne reçoivent que peu de matières alimentaires; si elles peuvent trouver du carbone dans l'atmosphère, elles ne sauraient y rencontrer les cendres et surtout l'azote, qui leur sont nécessaires; certains éléments faisant défaut, la multiplication est retardée et le carbone, qui seul continue à affluer dans la plante, est alors mis en réserve.

D'un autre côté on ne peut supposer que l'amidon s'accumule dans les cellules maintenues à l'obscurité, parce que la plante est incapable de l'utiliser sans l'aide de la lumière. Le 12 juin, en effet, je mets en train une culture dans une étuve obscure: le 9 août, la récolte pèse 430 milligrammes; les cellules ont une membrane épaisse et ne contiennent que peu d'amidon; comme au bout de quelques jours seulement les cellules en sont bourrées, il faut que l'amidon disparaisse avec le temps, c'est-à-dire qu'il soit consommé.

En somme, le *Cystococcus* s'est comporté comme la levure, dont le premier soin dès qu'elle est dans une solution sucrée, est de se faire dans son protoplasma une réserve de glycogène, qu'elle consommera en cas de disette.

Concluons que l'apparition de l'amidon dans les cellules de l'algue n'est pas liée à la présence ou à l'absence des radiations lumineuses, mais qu'elle est le fait des autres conditions de culture.

On sait que des feuilles vertes, dont les pétioles plongent dans des liquides contenant en solution certains hydrates de carbone, font à l'obscurité de l'amidon dans leurs cellules, et d'aucuns, comme Sachs, veulent en inférer que tout le carbone pris à l'atmosphère dans le libre exercice de la fonction chlorophyllienne doit passer par l'état d'amidon, avant d'être définitivement assimilé. Il est manifeste que tel n'est pas le cas du *Cystococcus*, l'amidon n'est qu'une forme de réserve du car-

bone, la plante peut se multiplier sans qu'il s'en produise dans les cellules.

4° *Rendement.* — J'ai fait des cultures comparatives à la lumière et à l'obscurité dans des boîtes de M. Roux. Comme, d'après ce que nous avons vu jusqu'ici, l'anhydride carbonique de l'atmosphère ne joue, vu sa quantité, qu'un rôle absolument négligeable vis-à-vis de celui qui est produit par la respiration, je n'ai pas dépouillé d'anhydride carbonique l'air qui arrivait sur les cultures; les vases étaient simplement fermés par un tampon de coton.

J'ai déjà dit que les cellules développées à l'obscurité sont très riches en grains d'amidon, or cet amidon n'est pas de la matière vivante, il n'est qu'une substance de réserve, ne différant du glucose ambiant que par sa plus grande condensation. Pour obtenir le rendement réel dans ces cultures, il faudra retrancher du poids de la récolte le poids de cet amidon; on connaîtra facilement celui-ci en déterminant la teneur pour 100 en substances saccharifiables de la plante venue à la lumière et de celle venue à l'obscurité, en retranchant le premier nombre du second et en calculant la différence en amidon. Ces saccharifications ont été effectuées en chauffant la plante dans une solution aqueuse d'acide sulfurique à 2 0/0 pendant un quart d'heure à 120°<sup>1</sup>.

Les résultats d'une expérience sont consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Numéros des expériences.	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Poids de la récolte en mgr.	Glucose consommé en mgr.	Substances saccharifiables 0/0.	Amidon 0/0.	RENDEMENT	
							apparent.	réel.
1	Obscurité.	13	40	80	59	13.2	0,50	0,43
2	Lumière.	—	490	914	44,3		0,53	0,53

Je ferai d'abord observer que les cellules développées à la lumière contiennent 44,3 0/0 de leur poids de matières réductrices. Ce nombre est très grand comparé à celui que donne la levure, qui, gorgée de glycogène, n'en renferme que 32,5 0/0

<sup>1</sup> A. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, 1902, p. 369.



d'après Laurent<sup>1</sup>. Les chiffres élevés trouvés pour le *Cystococcus* tiennent probablement à la présence dans les cellules d'hydrates de carbone, qui ne sont pas arrivés à l'état d'amidon, mais que l'acide sulfurique saccharifie. Il est aussi fort possible que sous l'action de l'acide, la cellulose se saccharifie partiellement, car on sait qu'« en traitant la levure par un acide pour transformer le glycogène en sucre, on risque de saccharifier aussi les portions les plus labiles de sa paroi cellulosique, qui semble, du reste, procéder du glycogène par des transitions insensibles<sup>2</sup>. »

Quoi qu'il en soit de l'origine des matières saccharifiables dans les récoltes du *Cystococcus*, elles existent, et j'ai dû me demander si, dans tous les calculs de rendement que j'ai faits, je n'aurais pas dû en tenir compte. Je ne le pense pas ; voulant comparer mes résultats avec ceux obtenus par d'autres pour la levure et l'*aspergillus*, j'ai dû me mettre dans les mêmes conditions qu'eux ; or, pour calculer le rendement dans des cultures de levure ou d'*aspergillus*, on n'a jamais déduit du poids de la récolte le poids des matières saccharifiables, qui, au moins pour la levure, est considérable, d'après les expériences de Laurent. Je n'avais aucune raison d'agir autrement.

Ceci dit, le tableau V permet de constater que le rendement réel est toujours moins élevé à l'obscurité qu'à la lumière, c'est donc à la lumière et selon toute probabilité à la fonction chlorophyllienne qu'est due la meilleure utilisation de la matière alimentaire, et par suite la valeur élevée du rendement dans les cultures faites sur glucose. Mais dans cette question la chlorophylle ne doit pas être seule mise en cause ; dans la culture 1, faite à l'obscurité, le rendement réel est égal à 0,43 ; il est sensiblement plus grand que celui, 0,33, obtenu dans des cultures de levure ou d'*aspergillus* effectuées dans des conditions analogues ; il semble donc que le protoplasma de l'algue soit organisé pour user avec économie des aliments : il dépenserait moins que celui d'une cellule de levure, par exemple, pour construire autant.

En résumé, il faut conclure que, si d'une manière générale on a raison d'attribuer à la lumière un rôle capital dans la vie des plantes vertes, on a certainement tort de s'imaginer que

1. LAURENT, *Ann. Inst. Past.*, 1889, t. III, p. 115.

2. DUCLAUX, *Traité de microb.*, t. III, p. 223.

toutes les cellules chlorophylliennes en ont également besoin. A ce point de vue, l'étude que nous venons de faire du *Cystococcus* est particulièrement instructive; il n'est aucune des fonctions que nous avons examinées, même la production de chlorophylle, qui ne se puisse exercer en l'absence des rayons lumineux; la plante peut dans ces conditions effectuer le cycle complet de son développement.

Ici encore l'algue se différencie nettement des plantes vertes plus élevées en organisation.

#### *Production d'alcool.*

J'ai dit qu'il était impossible de connaître exactement la quantité de carbone excrétée dans une culture; il est même fort difficile, vu leur très faible quantité, de déterminer seulement la nature des produits d'excrétion; mais il en est parmi eux un qui mérite de nous arrêter tout spécialement, c'est l'alcool.

Depuis quelque temps on envisage d'une manière toute nouvelle son rôle dans la vie des êtres. La découverte de son existence dans des cellules vertes a puissamment contribué à cette évolution des idées. Comme les faits qui servent de base aux nouvelles hypothèses sont encore peu nombreux, ceux que j'ai pu observer pendant le développement du *Cystococcus* auront leur intérêt.

Avant de les exposer, je rappellerai très brièvement les expériences qui ont établi que l'alcool pouvait se rencontrer dans les tissus des plantes vertes, mes propres expériences ne faisant que confirmer les résultats déjà obtenus.

1° *Historique.* — Après les grands travaux de Pasteur on n'imaginait pas que l'alcool pût être autre chose que le produit d'un état pathologique des cellules; on croyait que toutes les fois qu'une cellule normalement aérobie se trouve pour une raison quelconque en anaérobiose, ne pouvant prendre d'oxygène à l'atmosphère, elle en prend au sucre en excrétant de l'alcool. C'est à cette conclusion que parvinrent Lechartier et Bellamy<sup>1</sup>, Traube<sup>2</sup>, Brefeld<sup>3</sup>, Müntz<sup>4</sup> et nombre d'autres savants. Cette hypothèse, faisant de l'apparition de l'alcool le

1. LECHARTIER et BELLAMY, *C. R.* LXIX, 1869; LXXX, 1892; et LXXIX, 1874.

2. TRAUBE, *Ber. der. chem. Ges.* 1874.

3. BREFELD, *Landw. Jahrb.* 1876.

4. MUNTZ, *Ann. de chim. et de phys.* 1876.

corollaire de l'asphyxie des cellules, cadrerait parfaitement avec les faits observés chez les plantes dépourvues de chlorophylle; mais, s'il eût été prouvé que des cellules vertes, maintenues à la lumière et par conséquent dégageant de l'oxygène, pouvaient, elles aussi, produire de l'alcool, il eût fallu chercher une autre explication du phénomène ou tout au moins la modifier.

Or il en est réellement ainsi.

En 1882 M. Müntz<sup>1</sup> découvrit de l'alcool dans les tissus de plantes vertes ayant vécu à la lumière dans une atmosphère d'azote. Plus récemment M. Devaux<sup>2</sup> en a trouvé dans des tiges et des branches de plantes ligneuses ayant vécu dans des conditions normales. Mais dans un cas comme dans l'autre on pouvait se demander si la production d'alcool n'était pas la conséquence d'un commencement d'asphyxie des cellules dépourvues de chlorophylle.

M. Berthelot<sup>3</sup> fit faire un pas définitif à la question en établissant l'existence de traces d'alcool dans des feuilles vertes dont la vie avait été des plus normales.

Dès lors on était en droit de se demander, avec M. Duclaux, si cet alcool, qui prend naissance au sein des tissus les plus oxygénés, est réellement un produit d'élimination et s'il ne serait pas plutôt, comme l'amidon et les sucres, une forme transitoire que revêt le carbone avant d'être assimilé.

M. Mazé<sup>4</sup>, MM. Godlewsky et Folsening<sup>5</sup> ont récemment fourni des arguments en faveur de cette manière de voir; les sucres subiraient une série de dégradations successives, dont l'aboutissant serait l'alcool; celui-ci serait par oxydation transformé en aldéhyde, que le protoplasma utiliserait directement. L'alcool serait donc en somme pour la plante un aliment; con sommé d'ordinaire au fur et à mesure de sa production, il ne s'accumulerait dans les tissus que quand ceux-ci manqueraient d'oxygène pour le brûler. Ainsi s'expliqueraient d'une manière très plausible tous les faits connus jusqu'ici.

Comment cette question de la production de l'alcool se présente-t-elle dans le cas particulier du *Cystococcus*?

2° *L'algue peut faire de l'alcool.* — Je dirai tout de suite que

1. MUNTZ, *Comp. rend.*, LXXXVI.

2. DEVAUX, *C. R.* 1899.

3. BERTHELOT, *Trav. de la Stat. de Meudon*, 1899.

4. MAZÉ, *Comp. rend.* juin 1899, et *Ann. de l'Inst. Past.* 4902.

5. GODLEWSKY ET FOLSENING, *Anzeig. der. Allg. Wochenschr. in Krakau* juillet 1897



j'en ai toujours trouvé dans toutes les cultures que j'ai examinées, quelles que soient les conditions dans lesquelles elles avaient été faites. Mais il n'existe la plupart du temps qu'en si petites quantités qu'il faut le chercher avec soin pour le découvrir.

Voici comment j'ai toujours opéré.

Je distillais le liquide de culture en fractionnant les produits volatils; à cet effet, les vapeurs traversaient le serpentin en verre renversé de Schlœsing; sur ses spires supérieures j'observais les stries que forment en se condensant les liquides de tension superficielle plus faible que l'eau comme l'alcool; puis je recueillais les 10 premiers c. c. qui passent à la distillation, l'expérience m'ayant appris que tout l'alcool du liquide en expérience s'y trouve concentré. Je m'assurais enfin, autant que faire se peut<sup>1</sup>, par la réaction de l'iodoforme, que j'étais bien en présence d'alcool, la réaction de la fuschine décolorée par l'acide sulfureux m'ayant prouvé d'autre part que je n'avais pas affaire à de l'aldéhyde.

L'alcool contenu dans les 10 c. c. de liquide recueillis à la distillation était toujours dosé par la méthode de M. Nicloux<sup>2</sup>.

3<sup>e</sup> Marche de la production de l'alcool et causes qui influent sur elle. — Mettons en train 3 cultures dans des boîtes de M. Roux, renfermant chacune 100 c. c. de solution nutritive glucosée, et arrêtons-les à des moments différents pour peser les récoltes et doser l'alcool produit; dans le tableau VI sont consignés les résultats que nous obtenons :

TABLEAU VI.

Numéros d'ordre	Durée en jours.	Conditions d'éclairement.	Poids de la récolte en mgr.	Quantité d'alcool en mgr.
1	8	air libre.	68	3,5
2	11	id.	297	4,2
3	18	Au bout de 6 jours, le liquide de culture est mis sur une grande épaisseur à la température du laboratoire.	126	12,7

1. On sait qu'il n'existe aucun procédé pour caractériser avec une certitude absolue de petites quantités d'alcool.

2. Nicloux, *Comp. rend. de Soc. de biolog.*, t. III, 1896.

Les cultures 1 et 2 montrent que l'alcool ne s'accumule pas dans le liquide proportionnellement au poids de plante produit.

La culture 3 nous apprend quelque chose de plus; pendant 6 jours elle se fait dans les mêmes conditions que les cultures 1 et 2; mais au bout de ce temps la boîte est relevée et mise sur son petit côté, de manière que le liquide soit en couche épaisse et non plus en couche très mince, puis elle est laissée à la température du laboratoire; l'aération de la plante se fait mal à partir de ce moment et, comme conséquence, la teneur du milieu en alcool s'élève.

Somme toute, dans une culture bien aérée, la quantité d'alcool n'est jamais que très faible; elle ne devient notable que si la plante manque d'oxygène. C'est, toute proportion gardée, ce qui se passe pour la levure. Je dis « toute proportion gardée », parce que je n'ai jamais observé avec le *Cystococcus* de véritable fermentation, je n'ai jamais vu le moindre dégagement de bulles gazeuses, même dans les cas les plus favorables.

J'ai cependant une fois trouvé beaucoup plus d'alcool, dans un cas où il aurait dû n'y en avoir que très peu, si la question d'aération était seule en jeu; il s'agit d'une culture faite en présence non de 1 0/0 de sucre, mais de 1,7 0/0; j'ai au bout d'un mois recueilli 663 milligrammes de plante et j'ai dosé 51 milligrammes d'alcool dans le milieu. Ce dernier ne renfermait pas assez d'azote et peut-être d'acide phosphorique pour permettre un plus grand développement de la plante, qui, ne pouvant se multiplier, fabriquait de l'anhydride carbonique et de l'alcool qu'elle mettait en liberté. J'ai cité ce fait pour montrer comme tout s'enchaîne dans la vie d'un être et combien il est difficile de préciser les conditions qui régissent l'exercice d'une fonction.

La lumière semble n'avoir aucune influence sur la quantité d'alcool produite. En 58 jours j'ai récolté 430 milligrammes de plante à l'obscurité et le liquide de culture ne contenait que 5<sup>mgr</sup>,8 d'alcool.

4° *L'alcool est-il un produit intérimaire de la combustion du glucose?* — Si oui, il semble qu'il doive être pour la plante un aliment et doit plus que le glucose en accélérer le développement, comme le sucre interverti accélère plus que le saccharose celui de l'*Aspergillus*.

J'ai essayé de cultiver l'algue dans un milieu renfermant de

l'alcool absolu au lieu de glucose; j'ai toujours échoué. Si parfois, dans des vases de culture maintenus très longtemps à l'étuve, j'ai observé un commencement de développement, il fallait l'attribuer à la présence de l'anhydride carbonique de l'air, dont je n'avais pas, dans ce cas particulier, évité l'accès à la surface du liquide; ces cultures exceptionnelles, et d'ailleurs très pauvres, prouveraient simplement que l'alcool n'est pas aux doses employées un antiseptique pour le *Cystococcus*.

Pour être alimentaire en effet, l'alcool ne doit peut-être exister dans le milieu qu'en proportion infinitésimale, proportion que l'on dépasse toujours quand on l'ajoute artificiellement au liquide.

Une expérience va du reste nous fixer :

J'ai fait 2 séries de cultures dans les milieux suivants :

1<sup>re</sup> série. — Cultures en solution minérale glucosée à 1 0/00 et alcoolisée à 1 0/00.

2<sup>e</sup> série. — Cultures en solution minérale glucosée à 1 0/00.

Au bout de 11 jours j'ai reconnu que les poids des récoltes étaient sensiblement égaux dans les 2 séries. L'alcool n'a pas gêné le développement de la plante, il n'a donc exercé sur elle aucune action antiseptique.

L'expérience enseigne de plus que, même en présence du glucose, il n'a pas été consommé.

Il est fort possible que, par une série de passages dans des milieux contenant à la fois de moins en moins de glucose et de plus en plus d'alcool, je sois parvenu à *habituer* l'algue à se multiplier dans des liquides ne renfermant que de l'alcool comme substance hydrocarbonée; mais un tel résultat eût été sans intérêt, il n'eût pas prouvé que l'alcool est un produit intérimaire de la combustion du sucre, parce que rien ne dit que je n'aurais pu en obtenir un semblable avec d'autres substances; habituer une cellule à un aliment qu'elle ne consomme pas d'ordinaire est un problème qui bien souvent n'est pas insoluble.

Malgré tout, je ne crois pas devoir conclure que le carbone du sucre ne fait pas partie d'une molécule d'alcool avant d'être définitivement assimilé. Il faudrait admettre pour cela que l'alcool est un produit d'élimination inutilisable pour les cellules; or, s'il en était ainsi, l'alcool s'accumulerait dans le milieu proportionnellement au poids de plante, ce qui n'est pas; dans une



culture bien aérée il y en a environ 5 p. 100,000. Il doit donc selon toute probabilité, disparaître à mesure qu'il prend naissance et l'on ne dose jamais que l'excès de ce qui est produit, sur ce qui est consommé.

L'alcool est donc vraisemblablement un des échelons de la série de dislocations que subit la molécule de sucre avant que son carbone soit construit. C'est la seule hypothèse susceptible d'expliquer les faits. Si l'alcool que l'on introduit artificiellement dans un milieu de culture n'est pas consommé, cela peut fort bien tenir à ce qu'il ne se trouve pas du tout dans les conditions de l'alcool produit au sein du protoplasma. On sait que le fait existe pour le glycogène, qui, créé dans la cellule de levure, est consommé avec une très grande facilité, tandis qu'il ne l'est souvent qu'avec beaucoup de peine, quand on le donne comme aliment à la même levure.

3° *Tout le sucre doit-il être transformé en alcool pour être assimilé ?* — Nous avons été conduits à admettre qu'une fraction au moins du sucre absorbé devait prendre la forme d'alcool pour être assimilée ; mais la totalité du sucre doit-elle subir cette transformation ?

D'après les expériences de M. Mazé<sup>1</sup>, pour que l'alcool soit utilisé par les cellules végétales, il faut qu'elles puissent l'oxyder et pour cela que l'oxygène gazeux leur parvienne très largement. Or il est facile de se rendre compte de l'impossibilité d'une telle oxydation, si l'on suppose le dédoublement par la zymase de la totalité du sucre ; à partir d'un certain moment l'oxygène doit fatalement manquer.

Étant donnée une culture faite en atmosphère confinée, il est aisé, connaissant le poids du sucre disparu, d'en déduire les poids d'alcool et d'anhydride carbonique qui ont pu prendre naissance ; la composition de l'atmosphère une fois déterminée, on est à même de calculer le poids d'oxygène dont la plante a pu disposer.

Or, dans l'oxydation de l'alcool, le premier composé qui prend naissance, celui qui exige pour se former le moins d'oxygène, est l'aldéhyde.



La formule permet de calculer le poids d'oxygène nécessaire

1. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, 1902, t. XVI.

pour transformer en aldéhyde un poids donné d'alcool. Il est par conséquent facile de s'assurer si l'oxydation, ne fût-ce qu'au premier degré, de tout l'alcool qui a pu se produire a été possible ou non.

Je ferai cependant remarquer qu'en fait les chiffres n'ont pas la signification mathématique qu'ils semblent posséder au premier abord, et cela pour plusieurs raisons :

1<sup>o</sup> Il existe dans le liquide de culture, à la fin de chaque expérience, une quantité d'alcool que je n'ai pu déterminer; celui-ci s'est en effet vaporisé, quand j'ai extrait les gaz du ballon, et il était impossible de le condenser en totalité dans un réfrigérant même entouré de glace. Cet alcool n'a pas été oxydé; d'où une cause d'erreur dans l'évaluation de la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation de l'alcool;

2<sup>o</sup> Une très légère fraction de l'anhydride carbonique s'est combinée aux bases, qui du fait de la culture ont été mises en liberté dans la solution nutritive;

3<sup>o</sup> Les matières azotées se sont oxydées.

Ces deux dernières causes d'erreur font que l'oxygène dont la plante a pu disposer ne peut être, lui non plus, évalué d'une manière tout à fait rigoureuse.

Malgré leur imperfection, les nombres que j'ai obtenus sont intéressants.

Le tableau VII résume les résultats de 4 expériences faites en atmosphère confinée, 3 à la lumière et 1 à l'obscurité.

La culture 4 montre qu'en l'absence de lumière 21<sup>mgr</sup>,1 d'oxygène sur 70<sup>mg</sup>,3 absorbés, soit les 3/10, ont servi à d'autres oxydations qu'à celles de l'alcool, à celle des matières azotées par exemple; je puis même aller plus loin et affirmer qu'il y a plus des 3/10 qui ont été utilisés de cette façon; dans le cas de cette culture, en effet, qui a duré 33 jours, le ballon contient tellement d'anhydride carbonique que la plante a dû excréter une notable quantité d'alcool dans le milieu, alcool qui, étant resté tel quel, n'a pas été oxydé; le poids d'oxygène exigé par l'oxydation de l'alcool est donc inférieur à 49<sup>mgr</sup>,5, et par suite le poids d'oxygène employé à d'autres oxydations est supérieur à 21<sup>mgr</sup>,4.

Bien que ce qui passe dans la vie d'une plante à l'obscurité ne permette pas de conclure rigoureusement ce qui se passerait

TABLEAU VII.

N u m é r o s d'expé- riences.	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Glucose disparu.	Le dédoublement par la zymase a pu donner		CO <sub>2</sub> à la fin de l'expé- rience.	CO <sub>2</sub> décomposé par chloroph.	Oxygène dans CO <sub>2</sub> décomposé	Oxygène en + ou en - dans l'atmosphère.	Oxygène qui a été disponible.	Oxygène nécessaire pour l'oxydation de l'alcool.	Oxygène qui a été en excès ou en défaut.
				Alcool.	CO <sub>2</sub>							
1	Lumière.	41	245	124,9	420	32,5	87,5	63,9	+ 20,6	43,3	43,7	- 0,4
2	Lumière.	17	337	273,9	263,4	125,9	437,2	98,8	+ 18,5	80,3	95,9	- 15,6
3	Lumière.	25	505	257,5	247,4	436	444,4	80,2	- 41,6	91,8	90,1	+ 1,7
4	Obscurité.	33	277,5	441,5	435,6	445,9			- 70,5	70,6	49,5	+ 21,1

NOTA. — Tous les nombres du tableau représentent des milligrammes.



à la lumière, on peut certainement admettre que, même dans ce dernier cas, une très notable fraction de l'oxygène absorbé ne se combine pas à l'alcool.

Dès lors il est manifeste que dans les cultures 1 et 2, le *Cystococcus* n'a pu disposer d'une quantité suffisante d'oxygène pour oxyder tout l'alcool produit. Cette conséquence découle moins nettement de l'expérience 3, mais est encore dans ce cas bien vraisemblable, eu égard à la faible quantité d'oxygène qui a pu être en excès en supposant même l'alcool seul oxydé.

Il faut donc qu'une partie du sucre ait été assimilée sans être transformée en alcool.

En résumé, selon toute probabilité, le *Cystococcus* consomme le sucre, partie en le dédoublant en alcool et anhydride carbonique et partie sans lui faire subir cette transformation, mais par un mécanisme encore inconnu.

Au point de vue de la production de l'alcool, on ne peut dire que l'algue soit une plante de transition entre les plantes vertes et celles qui ne le sont pas, parce que la faculté de faire de l'alcool est générale chez les êtres vivants.

## II

### ASSIMILATION DU SACCHAROSE

Après l'étude de la consommation du glucose, se place tout naturellement celle du saccharose, dont il dérive généralement dans les tissus végétaux, et dont il dériverait même dans les feuilles, suivant Brown et Morris<sup>1</sup>.

Les cultures ont été faites dans la solution minérale indiquée page 377, additionnée de saccharose. Il faut cependant avoir soin de ne pas stériliser ce milieu de culture à l'autoclave, car le sucre de canne chauffé à 120°, en présence de phosphate, s'intervertit partiellement; force est donc d'avoir recours soit à la stérilisation par filtration, soit à la stérilisation séparée d'une solution de saccharose et de la solution minérale.

Le saccharose convient moins bien que le glucose au développement du *Cystococcus*; en 31 jours de culture je n'ai recueilli que 203 milligrammes de plante. Les cellules étaient pour

1. BROWN et MORRIS, *Jor. of. Chem. Soc.*, 1893.

la plupart petites, leur membrane mince, elles ne contenaient pas d'amidon et ne prenaient pas sous l'action de l'iode la moindre coloration bleue. Il semble donc que l'algue exposée à la lumière ne puisse pas faire d'amidon ni rien d'analogue en prenant son carbone au saccharose.

A quelque moment que l'on examine le liquide de culture, on le trouve sans action sur la liqueur de Fehling; le *Cystococcus* n'intervertit donc pas le sucre de canne en dehors de ses cellules. Il se comporte probablement comme la *monilia candida*<sup>1</sup> qui ne laisse pas diffuser de sucrase, mais dont le suc cellulaire intervertit le saccharose. En effet, outre qu'il est peu vraisemblable que le saccharose soit assimilé tel quel sans subir d'intervention, il est facile de s'assurer que dans certaines conditions la plante sécrète probablement de la sucrase. Si on la cultive dans un milieu contenant à la fois du saccharose et du glucose; on constate que les deux sucres sont consommés en même temps, car on trouve toujours du sucre réducteur dans le milieu, tandis que le saccharose disparaît peu à peu. L'algue préférant de beaucoup le glucose au saccharose, il faut admettre, ou bien que ce dernier est consommé parce qu'il se trouve en présence de l'autre, ou plutôt que le saccharose s'intervertit au fur et à mesure que la culture progresse.

Ce fait serait en somme de même ordre que ceux qui ont été signalés par MM. Gayon et Dubourg<sup>2</sup> à propos de certaines levures qui, ne laissant diffuser leur sucrase qu'en présence du glucose, n'intervertissent le sucre de canne en dehors de leurs cellules que dans ces conditions.

Le *Cystococcus* doit donc intervertir le saccharose pour le consommer et il doit assimiler également le dextrose et le lévulose; si en effet l'un des deux était consommé de préférence à l'autre, celui-ci s'accumulerait dans la cellule et y serait immobilisé dans un état insoluble, c'est-à-dire sous forme de grains d'amidon; or il n'en est rien. C'est ce que confirmera du reste l'étude de l'assimilation du sucre interverti.

Dans les cultures sur saccharose le rendement est très élevé. En 31 jours, j'ai recueilli 203 milligrammes de plante tandis que 247 milligrammes de saccharose avaient disparu du milieu; le rendement a donc été :

1. FISCHER et LINDNER, *Ber. der deut. chem. Gesellsch.*, t. XXVIII. 1895.

2. GAYON et DUBOURG, *C. R.* 1890.

$$R = \frac{203}{247} = 0,82(4)$$

Ce nombre élevé n'a rien qui doive surprendre; il prouve simplement que l'anhydride carbonique produit par la respiration, a pu être en grande partie décomposé par la fonction chlorophyllienne, et par suite que la culture a dû se faire lentement; nous le savons par ailleurs.

Le calcul donne pour valeur du coefficient d'utilisation du carbone :

$$Q = 0,95.$$

95 0/0 du carbone mis en œuvre sont donc construits, 5 0/0 seulement sont perdus. Ce résultat ne fait que confirmer ce que je viens de dire, à savoir que le saccharose est pour le *Cystococcus* moins bon aliment que le glucose, mais est bien plus économique que lui.

Maintenue à l'obscurité, la culture sur saccharose ne se fait qu'avec une extrême lenteur; en 34 jours je n'ai recueilli que 5 milligrammes de plante et en 53 jours 10 milligrammes. Nous sommes donc bien loin des cultures faites sur glucose. Les cellules de l'algue sont très vertes, mais, chose remarquable, elles ne contiennent pas d'amidon, quelques-unes cependant prennent une teinte bleue uniforme.

Il me semble difficile de conclure que le *Cystococcus* est incapable de faire la synthèse de l'amidon en partant du saccharose; il est probable qu'il ne le peut faire qu'aux dépens du sucre interverti; or, par suite de la lenteur de la culture, ce dernier ne se fait qu'en très petite quantité à la fois et doit être utilisé, aussitôt produit; c'est ce qui expliquerait qu'il n'y en ait jamais un excès susceptible d'être immobilisé à l'état insoluble.

1. On pourrait m'objecter que, contrairement à ce que j'ai dit page 388, ce rendement n'est pas calculé dans des conditions qui permettent de le comparer à celui que j'ai obtenu pour le glucose, parce que la durée de la culture, de 31 jours dans le premier cas, n'était que de 13 dans le second, et que les milieux renfermaient 2 0/0 de saccharose d'un côté et seulement 1 0/0 de glucose de l'autre. Cela est vrai; mais je ferai remarquer que plus une culture dure longtemps, plus la dépense d'entretien augmente, le rendement a donc une tendance à baisser à mesure que se prolonge le séjour à l'étuve; le nombre 0,82 obtenu au bout de 31 jours est donc plus faible que celui que j'aurais pu calculer au bout de 13 seulement; quant à la richesse en saccharose du liquide de culture, elle ne pourrait influer notablement sur la valeur du rendement que si au bout de 31 jours la plus grande partie du sucre était consommée, or il est bien loin d'en être ainsi. Du reste dans une culture faite en présence de 2 0/0 de glucose, j'ai obtenu un rendement de 0,56 nombre tout à fait comparable à celui, 0,54 calculé page 388.



## III

## ASSIMILATION DU SUCRE INTERVERTI

Le milieu de culture diffère un peu de celui que j'ai employé jusqu'ici, voici comment il a été préparé :

J'ai interverti du saccharose en le portant à l'ébullition dans de l'eau acidulée par l'acide chlorhydrique ; j'ai neutralisé l'acide par du carbonate de calcium en excès, puis après filtration de l'excès de carbonate, j'ai ajouté à la solution ainsi obtenue de sucre interverti et de chlorure de calcium les sels minéraux nécessaires au développement de la plante. Le milieu avait donc la composition suivante :

Sulfate de magnésium.....	1 gramme.
Phosphate bipotassique.....	2 grammes.
Nitrate de potassium.....	2 —
Chlorure de calcium.....	0gr.03.
Sulfate ferreux.....	traces.
Sucre interverti.....	10 grammes.
Eau.....	1000 —

Il a été chauffé à 120°, filtré, réparti dans les vases de culture, et enfin stérilisé à 120°.

Le *Cystococcus* s'y multiplie très rapidement, en 13 jours j'ai récolté 396 milligrammes de plante dans 100 c. c. de liquide.

Le poids de la récolte est tel qu'il est évident *à priori* que le dextrose n'a pas été seul consommé, l'étude du liquide en donne la preuve incontestable.

J'ai déterminé son pouvoir réducteur et son pouvoir rotatoire et j'ai pu ainsi calculer sa teneur en sucre interverti en glucose et en lévulose ; voici les nombres obtenus :

Glucose.....	105 mgr.
Lévulose.....	62 —
Sucre interverti.....	167 mgr.

Le lévulose est donc consommé un peu plus vite que le glucose, mais la plante n'a pas pour lui une préférence bien marquée, puisqu'elle assimile en même temps les deux sucres.

Dès lors, il est aisé de prévoir que le rendement doit être très voisin de celui obtenu dans les cultures sur glucose ; c'est en effet ce qui arrive :

$$R = \frac{396}{747} = 0,53$$

Il en est de même du coefficient d'utilisation du carbone qui a pour valeur :

$$Q = 0,64.$$

Jusqu'ici la culture sur le sucre interverti ne diffère pas d'une manière sensible, de celle faite sur glucose, mais voici qui va les distinguer.

Un grand nombre de cellules, qui ont vécu aux dépens du sucre interverti, contiennent des grains d'amidon bien nets; très probablement parce que les deux sucres affluent dans l'intérieur des cellules et ne sont pas consommés également vite; celui qui est en excès s'immobilise sous forme d'amidon.

De l'absence d'amidon dans les cellules nourries de saccharose, j'avais tiré cette conclusion que le *Cystococcus* devait assimiler également le glucose et le lévulose; c'est précisément ce qui arrive. La plante préfère un peu le second au premier, mais sa préférence n'est pas assez marquée pour qu'elle prenne la peine d'intervertir de nouvelles quantités de saccharose avant de faire disparaître complètement celui des deux sucres qui lui convient le moins.

A l'obscurité, le sucre interverti est assimilé beaucoup plus lentement qu'à la lumière, et les cellules sont très riches en amidon; on devait s'y attendre.

Le tableau VIII résume les résultats d'une expérience :

TABLEAU VIII

Numéro de la culture	Conditions d'éclairement.	Durée en jours.	Poids sec en mgr	Sucre interverti consommé en mgr.	Substances saccharifiables des cellules 0/0	Rendement.
1	obscurité.	41	433	945	51,3	0,47
2	lumière.	13	396	747	46,6	0,53

Il est intéressant de comparer les nombres de ce tableau avec ceux du tableau V (p. 396).

S'il s'agit du sucre interverti, la teneur de la plante en matières saccharifiables diffère beaucoup moins suivant le mode d'éclairement que s'il s'agit du glucose, la différence étant de 4,7 dans le premier cas, contre 14,7 dans le second; rien de

surprenant à cela, puisqu'en présence du sucre interverti les cellules éclairées contiennent elles-mêmes de l'amidon.

Dans les deux tableaux, les récoltes n<sup>os</sup> 2 faites à la lumière contiennent à peu de chose près la même quantité de matières saccharifiables, or les cellules de l'une contiennent de l'amidon concrété en grains, celles de l'autre prennent seulement sous l'action de l'iode une teinte bleue pâle uniforme; on est donc tout naturellement porté à croire que les substances de réserve de ces dernières sont peu différentes de l'amidon solide et sont la cause de la teinte bleue pâle que j'ai observée. Cette supposition que j'avais déjà faite (p. 390) semble recevoir ici une base qui lui manquait.

La récolte 1 sur sucre interverti renferme beaucoup moins de substances saccharifiables que la récolte 1 sur glucose; l'inégale durée des 2 cultures peut expliquer cette différence, car, dès que le milieu ne renferme plus de sucre, ce qui a été le cas de la culture sur sucre interverti, la plante attaque petit à petit ses réserves d'amidon et les fait disparaître.

## IV

## ASSIMILATION DU LÉVULOSE

Le milieu de culture qui m'a servi est de même que celui que j'ai employé dans l'étude du glucose et du saccharose, ces sucres étant remplacés par du lévulose cristallisé en proportion de 1 0/0.

Le tableau IX résume les résultats obtenus dans une expérience :

TABLEAU IX

Numéro de la culture.	Durée en jours.	Conditions d'éclairement.	Lévulose consommé en mgr.	Poids sec en mgr.	Rendement.
1	5	Lumière.	141	94	0,66
2	10	—	537	353	0,65
3	12	—	691	413	0,59
4	5	Obscurité.		20	
5	10	—	241	148	0,61



Le lévulose convient très bien au *Cystococcus* ; les poids des récoltes obtenus à la lumière sont tout à fait comparables à ceux recueillis sur le glucose, mais le rendement est légèrement plus élevé.

Quant au coefficient d'utilisation du carbone, il est :

$$Q = 0,73$$

Les cellules de la plante qui ont vécu à la lumière ne contiennent pas de grains d'amidon.

Le tableau IX montre, ce que j'ai déjà constaté avec les autres sucres, que le rendement baisse à mesure que la durée de la culture se prolonge.

Les récoltes obtenues à l'obscurité, offrent cet intérêt particulier d'être plus abondantes que des récoltes de même âge, obtenues sur glucose ; il semble donc que le *Cystococcus* ait moins besoin de lumière pour assimiler le lévulose que pour assimiler le glucose.

A l'obscurité les cellules de l'algue sont bourrées de grains d'amidon.

## V

### ASSIMILATION DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE

J'ai déjà fait remarquer que le *Cystococcus* devait préférer comme aliment le glucose au gaz carbonique ; on ne s'expliquerait pas autrement que la plante put dégager de l'anhydride carbonique quand elle consomme du glucose.

D'ailleurs, si dans la solution nutritive, employée dans tout le cours de ce mémoire, on supprime le sucre et qu'on laisse, comme unique source de carbone à la plante, l'anhydride carbonique de l'air, il faut maintenir la culture pendant plusieurs mois à l'étuve pour obtenir une récolte non point abondante, mais seulement appréciable.

On peut, il est vrai, objecter à cette expérience, qu'il y a dans le liquide trop peu de carbone (à cause de la faible proportion du gaz carbonique dans l'air) pour que la plante en trouve à satiété, comme c'est le cas pour les solutions sucrées. Les expériences en atmosphère confinée permettent de répondre à cette objection ; nous avons vu qu'en consommant le glucose dans ces conditions, la plante dégage une grande quantité

d'anhydride carbonique et j'ai montré que, quand il n'y a plus assez d'oxygène dissous dans le liquide pour la combustion du sucre, le *Cystococcus*, au lieu de prendre son carbone à l'atmosphère en cessant d'assimiler le glucose, continue au contraire à faire disparaître celui-ci, dès que, par l'action de sa chlorophylle, il s'est procuré assez d'oxygène pour le faire.

Le glucose est donc un aliment qui convient toujours mieux à la plante que l'anhydride carbonique.

Je n'ai pas cultivé l'algue, en atmosphère confinée, sur d'autres sucres que le glucose, mais ce que nous avons vu de leur assimilation fait prévoir qu'ils ne sauraient se comporter autrement que lui (sauf peut-être le saccharose).

Quand au rendement des cultures faites aux dépens du seul carbone de l'atmosphère, le faible poids des récoltes m'a naturellement empêché de le déterminer; mais ce calcul est pour ainsi dire inutile, le rendement ne peut être qu'excellent, comme du reste le coefficient d'utilisation du carbone. L'anhydride carbonique accélère moins que les sucres le développement du *Cystococcus* et est, à ce point de vue, moins bon aliment qu'eux, mais il est certainement le plus économique de tous.

Dans les cellules, qui n'ont pu trouver de carbone que dans l'air, je n'ai pu décèler aucun grain d'amidon; chaque cellule ayant à sa disposition les sels minéraux et l'azote dont elle peut avoir besoin, ne met pas de carbone en réserve: dès qu'elle en contient un excédent, elle l'utilise en se multipliant.

## VI

### QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR LA SYNTHÈSE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DANS LES CELLULES.

Si j'avais pu refaire sur le *Cystococcus*, ayant vécu exclusivement aux dépens du carbone de l'air, les expériences de MM. Brown et Morris <sup>1</sup> sur le *Tropœolum majus*, si j'avais pu déterminer la nature et la proportion de chacun des sucres présents dans les cellules de l'algue, les résultats, mis en face de ceux que j'ai obtenus dans les chapitres précédents, eussent donné des indications bien précieuses sur la synthèse de la

<sup>1</sup> A. BROWN et MORRIS, *Journ. of. Chem. Soc.* 1893.

matière organique par la plante. Malheureusement, il est impossible, en nourrissant le *Cystococcus* avec le seul carbone de l'atmosphère, d'obtenir une récolte suffisante pour permettre une pareille étude. J'en suis donc réduit à ne faire que des conjectures sur les mutations du carbone dans les cellules de l'algue.

La rapidité avec laquelle sont consommés le glucose et le lévulose fait supposer, avec beaucoup de vraisemblance, que ces sucres font partie de l'échelle de synthèse de la matière organique. Nous savons d'autre part que, vivant à la lumière, soit aux dépens de sucre, soit aux dépens de l'anhydride carbonique, le *Cystococcus* ne fabrique pas d'amidon dans ses cellules, à condition, bien entendu, que ni l'azote ni les sels minéraux ne lui fassent défaut; le carbone assimilé ne doit donc pas faire forcément partie d'une molécule d'amidon dans le cours de son évolution.

Le glucose et le lévulose seraient donc parmi les premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne; l'amidon, quand il s'en fait, ne serait qu'une forme de réserve de ceux-ci.

Quant au saccharose, j'ignore s'il prend jamais naissance dans les cellules; sa présence est d'autant plus douteuse qu'il est, nous l'avons vu, assimilé avec une très grande lenteur et ne saurait contribuer à l'amylogénèse. Il est donc difficile d'admettre qu'il puisse être l'origine du glucose et du lévulose dans la plante, comme dans les feuilles de *Tropœolum*; il en serait plutôt une forme de réserve.

## VII

### BILAN DU CARBONE

Faire le bilan du carbone dans la culture d'un végétal, c'est déterminer d'une part le poids de carbone mis en œuvre pendant une certaine période de la vie de la plante, et de l'autre les poids de carbone qui se trouvent à la fin tant dans la plante que dans l'atmosphère et le sol.

En se rappelant ce que j'ai dit au début de ce mémoire sur le rôle du carbone dans les végétaux, on comprendra de suite combien les nombres qui figurent dans l'établissement du bilan ont un sens peu précis, quand il s'agit de végétaux à chloro-



phylle. Néanmoins, si le bilan du carbone d'une expérience faite isolément offre peu d'intérêt, la comparaison des bilans de 2 expériences, faites simultanément, mais de durées différentes, est instructive.

Dans aucun cas, je n'ai fait à proprement parler un bilan : je n'ai pas dosé séparément le carbone disparu du milieu, celui contenu dans la récolte et celui excreté dans le liquide de culture ou dégagé dans l'atmosphère; j'ai expliqué, page 404, pourquoi la présence de l'alcool m'empêchait de le faire. Mais connaissant trois de ces données, on peut en déduire la quatrième par différence, c'est ainsi que j'ai dû opérer.

Je ferai ainsi le bilan du carbone dans 2 cultures faites simultanément en atmosphère confinée et à la lumière, mais arrêtées l'une au bout de 11 jours et l'autre au bout de 25.

La seconde culture est celle qui fait l'objet de l'expérience relatée page 381. Je donne ci-dessous les données expérimentales qui se rapportent à la première.

Au bout de 11 jours, le liquide de culture, qui renfermait au début 505 milligrammes de glucose, n'en contient plus que 260; la plante a donc consommé 245 milligrammes de sucre. Le poids de la récolte est de 140 milligrammes.

L'atmosphère du ballon a été étudiée comme il est dit page 382 et suivantes; elle renfermait 2,1 0/0 d'anhydride carbonique et 22 0/0 d'oxygène. Le tableau X résume les changements qu'elle a subis du fait du développement de l'algue (les nombres y représentent des cent. cub.).

TABLEAU X.

	Début de la culture.	Fin de la culture.	Gains.
CO <sup>2</sup>	0	16,5	16,5
O	158,1	172,5	14,4
Az	594,9	594,9	0
Totaux...	753	783,9	30,9

Je ferai remarquer en passant que l'oxygène dégagé montre

que la fonction chlorophyllienne s'exerce dès le début de la culture.

Pour établir le bilan du carbone dans les 2 expériences, voici la méthode suivie : le carbone mis en œuvre se déduit du poids de sucre disparu; celui qui est contenu dans les tissus de la plante est donné par l'analyse élémentaire de celle-ci, celui de l'atmosphère est calculé d'après le poids d'anhydride carbonique qu'elle renferme; enfin le carbone du liquide de culture est obtenu par différence; ce dernier comprend évidemment le carbone des carbonates produits par la combinaison d'une très faible partie du gaz carbonique dégagé avec les bases mises en liberté dans le milieu; il comprend aussi tout naturellement le carbone de l'alcool, qui s'est vaporisé au moment de l'extraction par la pompe à mercure des gaz du ballon.

Voici le bilan du carbone à la fin de l'expérience qui a duré 11 jours :

Carbone dans la plante .....	68 mgr.
— — l'atmosphère .....	9 —
— — le liquide .....	21 —
— du sucre disparu .....	98 mgr.

Le bilan du carbone dans l'expérience qui a duré 25 jours est le suivant :

Carbone dans la plante .....	409 mgr.
— — l'atmosphère .....	37 —
— — le liquide .....	56 —
— du sucre disparu .....	202 mgr.

Je l'ai dit, c'est la comparaison des 2 bilans qui est intéressante; elle permet, étant connu l'emploi des 98 premiers milligrammes de carbone pris au sucre, de trouver celui des  $202 - 98 = 104$  suivants; il est indiqué ci-dessous :

Carbone dans la plante .....	409 — 68 = 41 mgr.
— — l'atmosphère .....	37 — 9 = 28 —
— — le liquide .....	56 — 21 = 35 —
	104 mgr.

Dans la première période de sa vie (les 11 premiers jours), la plante fait surtout un travail de construction, puisqu'elle construit les  $7/10$  du carbone mis en œuvre.

Dans les 14 jours suivants, l'algue se multiplie peu et enrichit en carbone l'atmosphère et le liquide; c'est le moment où par sa zymase elle dédouble le sucre en alcool et anhydride carbonique, sans pouvoir oxyder l'alcool aussi vite qu'elle le produit; elle se livre alors surtout à un travail d'entretien.

Tout ceci ne fait que confirmer ce que j'ai dit de la marche de la consommation du sucre.

### CONCLUSIONS

Le *Cystococcus humicola* peut être cultivé dans une solution minérale glucosée ; les récoltes sont assez abondantes pour qu'on puisse les peser. La plante, dont toutes les cellules contiennent de la chlorophylle, prend néanmoins son carbone au sucre. Le rendement de ces cultures est très élevé, il dépasse  $1/2$  ; il est dû à ceci, que la plante est capable, d'une part d'assimiler le glucose, comme une mucédinée, sans se servir de sa chlorophylle, et de l'autre de décomposer à la lumière l'anhydride carbonique qu'elle dégage en respirant.

Des cultures en atmosphère confinée prouvent que, contrairement à ce qu'il était légitime d'attendre de la part d'une plante verte exposée à la lumière, le *Cystococcus*, qui prend son carbone au glucose, dégage beaucoup d'anhydride carbonique ; il ne se met à décomposer ce gaz d'une manière énergique par sa chlorophylle que quand il manque d'oxygène pour brûler le sucre.

Les cellules, qui ont vécu à la lumière, ne renferment pas de grains d'amidon, mais très probablement des corps qui en dérivent comme l'amidon soluble, les dextrines.

À l'obscurité, la plante se multiplie plus lentement qu'à la lumière ; ses cellules contiennent de la chlorophylle et sont remplies de gros grains d'amidon, qui disparaîtront quand l'algue aura faim de carbone. Le rendement réel est plus élevé que celui que l'on obtiendrait dans les mêmes conditions avec une plante sans chlorophylle, peut-être à cause de qualités spéciales du protoplasma des cellules vertes du *Cystococcus*.

Toutes les cultures renferment de l'alcool, en très petite quantité, quand l'aération n'a rien laissé à désirer, mais en proportion plus considérable si la plante a manqué d'oxygène.

Le saccharose est consommé par le *Cystococcus*, beaucoup plus lentement cependant que le glucose ; le rendement est très élevé, il atteint 0,82. Le sucre n'est pas interverti en dehors des cellules, à moins que le liquide de culture ne contienne déjà au préalable du sucre interverti ; condition qui sollicite l'excrétion



de la sucrase. Quelles que soient les conditions d'éclairement, les cellules ne renferment pas d'amidon.

Le sucre interverti est un aliment qui aide beaucoup au développement rapide de la plante; le lévulose est absorbé un peu plus vite que le glucose. A la lumière, aussi bien qu'à l'obscurité, les cellules fabriquent de l'amidon, probablement parce que les deux sucres ne sont pas assimilés aussi vite l'un que l'autre.

Le *Cystococcus* prend très facilement son carbone au lévulose et l'utilise fort bien; en l'absence de lumière, ses cellules contiennent de l'amidon.

Tous les sucres précités sont des sources de carbone que l'algue préfère à l'anhydride carbonique, mais ce sont des aliments moins économiques.

L'alcool produit par la plante dans les milieux sucrés est vraisemblablement un produit intérimaire de la combustion du sucre ou, autrement dit, un aliment qui a besoin d'être oxydé pour être utilisé. Il semble que tout le sucre absorbé ne subisse pas cette transformation, et qu'une fraction puisse en être assimilée, sans être dédoublée par la zymase.

Quand la plante prend son carbone à l'atmosphère, le glucose et le lévulose sont probablement parmi les premiers produits de l'assimilation chlorophyllienne; l'amidon n'en est qu'une forme de réserve.

La comparaison des bilans de cultures, faites en milieu glucosé et en espace clos, prouve que, tant que le *Cystococcus* ne manque pas d'oxygène, il construit la plus grande partie du carbone mis en œuvre, pour se livrer surtout à un travail d'entretien, quand l'oxygène vient à lui faire défaut.

Je viens de résumer tous les faits que j'ai pu établir concernant la vie du *Cystococcus*: un grand nombre prouve bien que cette algue est une plante de transition, qui, par ses propriétés, vient combler le vide qui existe entre les plantes pourvues de chlorophylle et celles qui n'en ont pas.

1<sup>o</sup> Elle peut, comme une mucédinée, consommer rapidement le glucose, le sucre interverti, le lévulose, le saccharose;

2<sup>o</sup> Dans ces cultures sur milieux sucrés, le coefficient d'utilisation du carbone est plus élevé que dans des cultures analogues de mucédinées ou de levure, mais il est moins fort que

s'il s'agissait de plantes vertes prenant leur carbone à l'anhydride carbonique ;

3° Dans une atmosphère confinée, la vie de l'algue se rapproche beaucoup au début de la culture de celle d'une mucédinée, pour être à la fin identique à celle d'une plante verte ; dans l'intervalle, sa manière d'être tient à la fois de celles de deux sortes de plantes ;

4° Le *Cystococcus*, à l'inverse de presque toutes les plantes vertes, peut faire la synthèse de sa chlorophylle à l'obscurité ;

5° Mais il ressemble à ces plantes en ce qu'il est capable de concréter de l'amidon en grains dans ses cellules ;

6° J'ajouterai aussi que comme elles, il peut prendre très facilement son azote aux nitrates et sous certaines réserves à l'anmoniaque. ainsi que je l'ai établi dans un précédent mémoire<sup>1</sup>.

Avant de conclure avec certitude que le *Cystococcus* est bien une plante de transition, je veux répondre à une objection qui vient naturellement à l'esprit.

J'ai dit, page 372, que M. Mazé avait constaté que le maïs peut à l'obscurité prendre de très faibles quantités de carbone au glucose ; on est donc en droit de se demander si, en suivant avec soin et à la lumière le développement du maïs, on n'observerait pas des faits identiques à ceux dont j'ai reconnu l'existence chez le *Cystococcus*, et si les phénomènes que j'ai découverts dans la vie de ce dernier ne seraient pas généraux dans les plantes à chlorophylle, mais encore inconnus chez elles parce que l'étude n'en a pas été faite. Il n'en est rien. En examinant, en effet, les nombres donnés par M. Mazé, on est frappé de voir combien est faible l'accroissement de poids de la plante alimentée avec du glucose, ce qui concorde du reste absolument avec les résultats obtenus par M. Duclaux pendant la germination des haricots et des pois. Ces nombres sont tellement inférieurs à ceux fournis par le *Cystococcus* vivant à l'obscurité qu'ils suffisent amplement à prouver combien cette algue est plus apte à consommer les hydrates de carbone, et qu'elle est bien un être à part, comme tout ce mémoire le démontre.

Reste à se demander quelle est la place que paraît occuper le *Cystococcus* au point de vue phylogénique. La paléontologie

1. P.-G. CHARPENTIER, *Annales Institut Pasteur*, mai 1903.

enseigne que les plus anciennes plantes connues, celles dont on trouve les restes dans les premiers terrains paléozoïques, sont des algues vertes; les premiers représentants du règne végétal à la surface du globe auraient donc été des plantes vertes. Cette hypothèse est très plausible; tous les êtres dégageant de l'anhydride carbonique, la vie fût devenue rapidement impossible sur la terre, s'il n'avait existé dès l'origine des êtres pouvant verser constamment de l'oxygène dans l'atmosphère, c'est-à-dire des plantes à chlorophylle. Il n'y a du reste aucune difficulté à admettre que certaines d'entre elles, trouvant de grandes quantités de matière organique à consommer, aient peu à peu perdu la faculté d'assimiler le carbone aérien et se soient adaptées à une vie parasitaire sur un substratum riche en carbone combiné.

Le *Cystococcus humicola* serait une plante de passage représentant un végétal vert en train de s'adapter à une vie nouvelle, celle dont jouissent actuellement les mucédinées.



LES

# Entomophytes du charançon des betteraves à sucre.

(*Cleonus punctiventris*.)

PAR J. DANYSZ ET K. WIZE.

---

(Travail du Laboratoire de microbe agricole à l'Institut Pasteur de Paris et de la station  
d'entomologie expérimentale de la « Société des fabricants de sucre de toute la Russie »  
de Smela. (Gouvernement de Kieff.)

---

Les champignons pathogènes des insectes avaient été connus et étudiés bien longtemps avant les agents des maladies contagieuses de l'homme et des animaux supérieurs. Les naturalistes de la fin du XVIII<sup>e</sup> et du commencement du XIX<sup>e</sup> siècle en ont décrit quelques espèces, sans, toutefois, chercher à comprendre leur importance et leur rôle comme agents pathogènes.

Mais, déjà en 1836, on trouve une série de travaux de Bassi<sup>1</sup>, Balsamo, Barbò, Audouin<sup>2</sup>, Montagne<sup>3</sup>, Turpin<sup>4</sup> sur les Muscardines des vers à soie. où la nature contagieuse de la maladie et le rôle du champignon comme agent pathogène spécifique avaient été nettement reconnus. Ainsi, Audouin, Montagne et Turpin ont pu reproduire la maladie à volonté en transportant les spores du champignon (*Botrytis* ou *Isaria*) des chenilles muscardinées sur des chenilles saines des vers à soie et de plusieurs autres espèces d'insectes, en inoculant ces spores sous la peau ou simplement en mettant des individus sains en contact avec les muscardines. Ils ont même essayé, quelquefois avec succès, de cultiver la muscardine sur des milieux nutritifs artificiels.

Ces travaux n'ont pourtant éveillé alors que très peu d'atten-

1. BASSI, *C. R.* 1836, t. II, p. 434.

2. AUDOUIN, Recherches anatomiques et physiologiques sur la maladie contagieuse qui attaque des vers à soie, et qu'on désigne sous le nom de Muscardine, *C. R.*, t. III (1836) p. 82.

3. MONTAGNE, *C. R.*, 1836, t. III, p. 166.

4. TURPIN, *Ibid.*, p. 170.

tion; pendant plus de 30 ans personne n'a eu l'idée de les reprendre et de les pousser plus loin.

Ce n'est, en effet, qu'en 1867, que l'on trouve une nouvelle étude d'une muscardinose due au *Botrytis bassiana*, observée par de Bary<sup>1</sup> sur le Bombyx Pini, insecte qui ravageait alors les forêts de l'Allemagne.

De Bary a trouvé que son botrytis n'envahit et ne se développe bien que sur des insectes vivants, que les spores placées à la surface de la cuticule d'une chenille vivante ne tardent pas à germer, et que les filaments mycéliens traversent la cuticule pour se ramifier et donner des conidies dans la cavité générale du corps. Ces mêmes spores, ensemencées sur une chenille morte, ne donnaient pas de culture.

De Bary n'a pas manqué de signaler l'importance pour l'économie agricole et forestière de ces champignons entomophytes qui, complètement inoffensifs pour les plantes et les animaux supérieurs, confèrent une maladie très contagieuse et toujours mortelle à un grand nombre d'espèces d'insectes. Mais, à cette époque, on ne connaissait pas encore les milieux de culture artificiels stériles, on ne pouvait pas obtenir des muscardines en cultures pures, il n'était donc guère possible de songer à multiplier ces champignons pour favoriser le développement des épidémies parmi les insectes et intervenir ainsi dans la défense des plantes.

Ce fut M. Metchnikoff, alors professeur à l'Université d'Odessa, qui, le premier, a eu cette idée et a pu la réaliser en 1878.

S'inspirant des travaux de de Bary, M. Metchnikoff s'est mis à la recherche d'un champignon pathogène pour le hanneton du blé (*Anisoplia austriaca*) qui faisait beaucoup de ravages en Russie méridionale.

M. Metchnikoff ne tarda pas à trouver des larves atteintes par divers parasites et principalement par une muscardine qu'il appela *Isaria destructrix*.

Peu de temps après, il trouva le même champignon sur un autre insecte, le *cleonus punctiventris*, un coléoptère très nuisible aux cultures des betteraves.

M. Metchnikoff est arrivé promptement à cultiver sa mus-

1. DE BARY, Zur Kenntniss Insectentödtenden Pilze. *Bot. Zeit.*, t. XXV, 1867, p. 4, 9, 17 et *ibid.*, t. XXVII, 1869, p. 582.

cardine à l'état de pureté sur un bouillon préparé avec du moût de bière, et à infecter avec des spores provenant de ces cultures les *anisoplia* et les *cleonus* à tous les stades de leur développement.

La question de l'utilisation des muscardines dans la pratique était donc résolue en principe : en cultivant ces champignons sur des milieux nutritifs artificiels, on pouvait multiplier à volonté les foyers de contagion et arrêter le développement excessif des insectes ; aussi l'impulsion donnée par M. Metchnikoff n'est-elle pas restée sans écho.

De nombreux naturalistes et agronomes se sont mis à l'œuvre, pour rechercher de nouvelles espèces d'entomophytes pathogènes pour les insectes les plus répandus et les plus nuisibles, et pour étudier les conditions de leur développement dans la nature et sur des milieux nutritifs artificiels.

Ainsi, à côté de nombreux travaux sur les *entomophytérées* qui nous intéressent moins pour le moment, parce qu'on n'a pas encore réussi à les cultiver, nous trouvons des travaux de Sorokin <sup>1</sup> sur un champignon pathogène pour l'*Agrotis segetum* (*Sorospora agrotidis*) ; de MM. Taxter, Forber <sup>2</sup> et Snow <sup>3</sup> sur un champignon (*Sporotrichum globuliferum*) pathogène pour le *Blissus leucopterus*, une petite punaise qui dévaste les champs des céréales aux États-Unis de l'Amérique du Nord ; de M. A. Giard <sup>4</sup>, sur un parasite du Criquet pèlerin, le *Lachnidium acridiorum* et un mémoire très important sur l'*Isaria densa*, un champignon pathogène pour le hanneton commun. Dans ce travail, M. Giard étudie avec beaucoup de détails l'évolution et les conditions de développement de ce champignon sur les insectes contaminés et sur des milieux nutritifs artificiels.

La production et l'application en grand de ces entomophytes et notamment de l'*Oospora destructrix*, Delacroix (*Is. destructrix* de Metchnikoff) de l'*Isaria densa*, Gd. (*Botrytis tenella*, Prillieux

1. SOROKIN, dararitologirche Skizzen (*Centr. bl. f. Bact.* 1888, p. 645).

2. S. A. FORBER, Studien of the contagions diseases of insects. (*Bulletin of the Illinoisetat. Labr of nat. hist.*, vol. II, 1886).

3. F. H. SNOW, Contagions diseases of the Chinch Bug. 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> report 1892, 93 et 94 (*University of Kansas, Laurence*).

4. A. GIARD, Sur le champ. paras. des criquets pèlerins (*Lachnidium acridiorum*) C. R. 7 décembre 1891.

Et l'*Isaria densa* (Linx) Fries, champignon parasite du hanneton commun. *Bulletin scientifique de la France et de la Belgique*, XXIV, 1893.



été tentés par Krassilstchik en Russie, avec l'*Oospora* contre le charançon des betteraves (*Cleonus punstiventris*); par Le Moul't en France avec l'*Isaria densa* contre les hannetons et leurs larves, les redoutables « vers blancs », et enfin par Snow en Amérique et Trabut en Algérie, qui ont essayé de propager les épidémies causées par le *Sporotrichum*, le premier parmi les punaises des blés, le second parmi les altises de la vigne.

Tous ces premiers essais, entrepris dans des conditions souvent défectueuses et toujours avec des moyens trop restreints, n'ont pas pu donner les résultats qu'on en attendait.

On avait bien des cultures extrêmement virulentes pour les insectes, des cultures qui, au laboratoire, dans les essais en petit, tuaient infailliblement tous les insectes contaminés, mais on se heurtait, pour l'application de ces champignons en grande culture, à des difficultés, pour le moment insurmontables.

Les entomophytes ne se développent bien, ainsi que l'a déjà remarqué de Bary, que sur des microbes vivants ou sur des milieux nutritifs artificiels parfaitement stériles, et les méthodes de culture que l'on possédait alors étaient trop couteuses pour rendre possible leur application en grand.

C'est ainsi, par exemple, que M. Le Moul't cultivait l'*Isaria densa* sur des pommes de terre coupées en morceaux cylindriques de la grosseur d'un crayon et enfermés dans des tubes de verre. Chacun de ces tubes pouvait donner en 2 mois à peu près 2 à 3 grammes de culture et coûtait 1 franc. Pour propager la contagion dans un champ envahi par des vers blancs, M. Le Moul't conseillait d'employer 10 à 20 de ces tubes par hectare, de faire enterrer un fragment de culture tous les quelques mètres.

On ne pouvait guère en mettre davantage, parce que le prix du traitement risquerait de dépasser la valeur de la récolte; mais il ne faut pas s'étonner qu'un tel traitement n'ait jamais pu donner des résultats appréciables.

Pour propager l'épidémie parmi les punaises des blés, M. Snow n'employait pas des cultures artificielles, mais des « momies »<sup>1</sup> d'insectes contaminés par le *Sporotrichum globuli-*

1. On appelle *momie* le corps d'un insecte tué par une muscardine. Tout l'intérieur du corps est alors rempli par le sclérote du champignon. Le cadavre devient dur et peut être conservé pendant très longtemps.

*ferum*. Cette méthode présentait encore plus d'inconvénients que celle de M. Le Mout : M. Snow ne pouvait obtenir ses cultures à l'état de spores qu'au moment où les invasions étaient déjà généralisées et avaient déjà produit des dommages considérables, et la quantité de culture qu'il pouvait obtenir en temps utile était trop minime pour les vastes espaces qu'il y avait à traiter.

On avait donc été obligé de reconnaître que, pour rendre les entomophytes utilisables dans la pratique, il fallait encore de nouvelles recherches. Il fallait établir, par une série d'expériences, les conditions dans lesquelles les cultures des entomophytes doivent être réparties dans les champs pour atteindre les insectes, et trouver une méthode de culture permettant de produire ces champignons en quantités suffisantes pour obtenir des résultats appréciables ; il fallait, en outre, trouver un ensemble de circonstances permettant d'entreprendre ces recherches dans des conditions favorables et de les poursuivre pendant quelques années sans interruption.

Nous avons trouvé cet ensemble de circonstances en Russie méridionale, dans une région où on cultive principalement des betteraves à sucre, et où ces plantations sont envahies régulièrement chaque année par le charançon des betteraves, le *cleonus punctiventris*.

Les dommages causés par cet insecte peuvent être évalués à quelques millions de roubles par an, et, malgré les moyens de défense et de destruction employés, les quantités des insectes qui réapparaissent chaque année ne semblent pas diminuer ; bien au contraire, l'invasion s'étend de plus en plus sur des régions jusqu'alors indemnes.

En présence de l'importance croissante de ces dommages, la « Société des fabricants de sucre de toute la Russie » a résolu, sur l'initiative de son président, le comte André Bobrinskoy, de soumettre la question de la défense des betteraves à une étude systématique et nous a confié le soin d'organiser ces recherches.

Nous avons commencé nos recherches en 1900, et ce sont les principaux résultats de nos observations et expériences sur le rôle et l'application possibles des entomophytes, faites dans le courant de ces trois années, que nous résumons dans les chapitres qui suivent.

*Le charançon de betteraves (cleonus punctiventris).*

Le *cleonus punctiventris* est une des plus grandes espèces du genre des *curculionidæ*. En dehors du midi de la Russie, où il s'est multiplié d'une façon tout à fait anormale, cet insecte n'a été signalé encore comme nuisible à l'agriculture qu'en Moravie et en Hongrie. En Russie, il a envahi jusqu'à présent les plantations des betteraves dans les gouvernements de Charkoff, de Kieff et de Podolie; il est encore à peu près inconnu en Volhynie et en Bessarabie et aussi plus à l'Est, où la culture des betteraves à sucre est un peu plus récente.

Avant l'introduction de ces cultures, le cléonus était inconnu dans ces régions en tant qu'insecte nuisible. Il vivait alors aux dépens de nombreuses chénopodiacées sauvages qui poussaient en abondance sur les vastes steppes encore incultes à cette époque.

Dans les endroits où on a défriché les steppes pour faire aussitôt de la betterave, le cléonus a donc passé directement des chénopodiacées sauvages sur ces plantations, tandis que dans les régions où, comme en Podolie, on a débuté par la culture des céréales, il a tout d'abord presque complètement disparu, faute d'une nourriture appropriée. Actuellement il envahit ces régions de nouveau par extension, et il n'est pas douteux que, si l'on ne trouve pas de moyens efficaces pour s'en défendre, il finira par envahir toutes les régions où la culture des betteraves sera faite en grand d'une façon durable, et où il trouvera un ensemble de conditions aussi favorables que dans le bassin du Dniéper, c'est-à-dire un sol bien meublé, de vastes plaines peu boisées et presque complètement dépourvues d'oiseaux insectivores, des printemps et des étés relativement bien secs, et surtout un assolement à longues périodes.

Les *cléonus* commencent à sortir de terre à l'état d'*imago* avec les premiers chauds rayons du soleil du printemps. Leur sortie accompagne ou précède un peu la germination et l'apparition des premières feuilles des betteraves, et c'est à ce moment qu'ils sont le plus dangereux. Un seul insecte peut dévorer en quelques minutes les deux petites feuilles qui apparaissent les premières et faire périr la plante; aussi, quand on trouve à ce moment 10 insectes par m. q. et quand on n'a pas les moyens de les ramasser rapidement, la récolte sera complètement perdue.



Leur sortie de terre s'opère à peu près pendant 2 mois (avril et mai), et comme ils vivent pendant 1 mois à six semaines (plus longtemps quand il fait froid que quand il fait chaud), on en trouve en abondance dans les champs pendant 3 mois 1/2.

Tous les efforts des cultivateurs tendent à préserver les récoltes surtout pendant les premiers 2 mois, jusqu'au moment où les betteraves seront assez grandes pour mieux résister elles-mêmes aux attaques des insectes. Pour préserver les récoltes, on est obligé de faire ramasser les cléonus chaque jour, pendant à peu près 2 mois.

L'accouplement des cléonus, suivi bientôt de la ponte des œufs, ne commence guère avant le 15 mai et dure 1 mois. La femelle pond, en moyenne, 40 œufs qu'elle dépose un à un, séparément, dans de petits trous qu'elle creuse avec son rostre à la surface du sol et qu'elle comble ensuite avec soin.

A la fin de juin on trouve déjà des larves attachées aux racines des betteraves, en août des nymphes, et en septembre des insectes parfaits. Bien entendu, il y a pour le cléonus, comme pour tout autre insecte, des exceptions à cette règle générale : on trouve des larves et des nymphes en octobre et en avril, il y a donc des individus dont le développement peut être retardé ou accéléré, mais ces quelques irrégularités sont de peu d'importance au point de vue qui nous préoccupe.

Les cléonus peuvent se nourrir de feuilles des chénopodiacées et de quelques papillonacées, mais ils manifestent toujours pour les feuilles des betteraves une prédilection très marquée. Aussitôt sortis de terre au printemps, ils s'empressent donc de quitter tous les autres champs pour envahir les plantations des betteraves; on les voit alors cheminer à travers les champs et les routes pour s'y rendre.

L'usage adopté en Russie de ne faire revenir les betteraves que tous les 4 ou 6 ans sur les mêmes champs, oblige les insectes de faire chaque année ces longs voyages, et les agriculteurs ne manquent pas de profiter de cette particularité pour en capturer un très grand nombre dans de petits fossés à parois verticales dont ils entourent les champs de betteraves. On en ramasse ainsi des centaines de quintaux chaque année dans chaque ferme.

Pendant les premiers 15 à 20 jours après leur sortie de terre, on trouve donc des cléonus un peu partout, mais ils se concen-

trent peu à peu tous sur les champs de betteraves; quand le soleil commence à chauffer, ils les envahissent au vol.

Pour déterminer les conditions d'une intervention éventuelle, il importe donc de noter que le cléonus vit à peu près un an, qu'il passe 10 mois de l'année dans la terre, de mai jusqu'en septembre à l'état d'œuf, de larve et de nymphe, de septembre jusqu'au printemps suivant à l'état d'imago et à la surface du sol pendant les 2 à 3 mois du printemps.

Le cléonus cause deux sortes de dommages: il mange à l'état d'imago les feuilles des betteraves au printemps, et à l'état de larve, les racines dans le courant de l'été. Pour défendre les feuilles, on a la ressource de ramasser les insectes ou de les empoisonner en aspergeant les feuilles avec des sels de baryum ou d'arsenic, et on le fait depuis longtemps déjà avec assez de succès, mais aucun moyen mécanique ou chimique ne peut convenir pour défendre les racines contre les dommages causés par les larves. Or la quantité d'insectes qui échappent au ramassage et à l'empoisonnement, et qui peuvent pondre des œufs sur les champs des betteraves, est encore toujours assez considérable pour causer des dommages très sensibles, et donner pour l'année suivante une nouvelle génération de cléonus, aussi nombreuse et le plus souvent même plus nombreuse que celle qui l'a précédée.

Il nous a donc semblé que seuls les ennemis naturels du cléonus, les insectivores (calosoma, mermis) et les entomophytes peuvent intervenir ici d'une façon efficace, et comme nous n'avions aucun moyen de favoriser le développement des insectivores, nous avons cherché à multiplier les entomophytes sur des milieux artificiels et à propager l'épidémie parmi les larves du cléonus à l'aide de ces cultures.

#### LES ÉPIDÉMIES SPONTANÉES DU CHARANÇON DE LA BETTERAVE

Avant de faire intervenir les cultures artificielles des entomophytes, il était nécessaire d'établir les conditions dans lesquelles se produisent les épidémies spontanées parmi les cléonus. Nous savions déjà, par les travaux de M. Metchnikoff et par les observations des agriculteurs locaux, que ces épidémies n'étaient pas rares; qu'à l'automne, au moment de la récolte et

même au printemps suivant, quand on labourait les anciens champs de betteraves, on trouvait toujours dans la terre des larves, des nymphes et même des jeunes *imago* « muscardinés ». On ne trouvait, par contre, presque jamais un *imago* contaminé au printemps à la surface du sol.

Un essai très simple nous a montré pourtant que les insectes adultes n'étaient pas réfractaires aux maladies causées par divers entomophytes : il suffisait d'en introduire un certain nombre dans une assiette garnie d'un peu de terre et de les mettre en contact avec une culture d'oospora, d'isaria ou de sporotrichum, pour les voir mourir infectés au bout de 5 à 10 jours.

En répétant l'expérience dans différentes conditions de température, d'humidité et de lumière, nous avons reconnu que les insectes adultes pouvaient être contaminés déjà à une température de 15°, à la condition d'être placés à l'obscurité ou à la lumière diffuse, tandis qu'une exposition de quelques heures par jour en plein soleil empêchait, le plus souvent, la contagion de se produire.

Les insectes qui sortent de terre au printemps ont souvent, avant d'arriver à la surface, à traverser une couche de terre très riche en entomophytes ; un grand nombre a dû nécessairement venir en contact avec les spores de ces champignons et se contaminer, mais, parvenus à l'air, ils échappent à l'infection grâce à l'action stérilisante du soleil.

Là où la contagion naturelle restait sans effet, nous n'avions aucune chance de réussir avec une contagion artificielle. Les épidémies spontanées sont, au contraire, très fréquentes dans la terre et il nous a semblé qu'il suffirait de connaître les conditions dans lesquelles elle se développent d'elles-mêmes pour arriver sans beaucoup de peine à en favoriser la propagation au moyen de cultures artificielles.

Nous avons vu que les œufs du *cleonus* sont pondus en mai, que les larves aussitôt écloses s'enfoncent dans la terre pour subir toutes leurs transformations ultérieures, et que les insectes parfaits, formés en septembre-octobre, restent dans la terre jusqu'au printemps suivant. Pour étudier le développement des entomophytoses, il fallait donc commencer les recherches dans la terre depuis le mois de juin et les poursuivre jusqu'à la fin de l'automne.

En creusant dans différentes parties d'un champ de betteraves des trous de 1 m. q. sur 50 cm. de profondeur et en tamisant avec soin la terre enlevée, on peut assez exactement établir la quantité de larves qui ont envahi le champ et la proportion de celles qui ont succombé à l'infection.

Dans le tableau ci-contre (n° I), nous avons résumé les résultats de recherches exécutées de juin en septembre dans trois champs de betteraves d'une ferme,

TABLEAU I.

N°s des champs.	Dates des recherches.	Insectes vivants par m. c. en moyenne.			Insectes morts infectés par m. c. en moyenne.		
		larves.	nymphes.	imago.	larves.	nymphes.	imago.
Champ N° 1.	juin.	207	—	5	6	—	—
	juillet.	86	—	2	86	—	—
	août.	12	9	—	93	44	—
	septemb.	—	1	3	15	37	22
De 207 larves qui ont envahi le champ en juin, 4 seulement ont échappé à l'infection et ont pu arriver au terme de leur développement.							
Champ N° 2.	juin.	282	—	6	18	—	—
	juillet.	33	—	1	91	—	—
	août.	17	16	—	32	66	—
	septemb.	—	—	4	—	11	22
De 282 larves en juin, 4 insectes ont survécu jusqu'en octobre.							
Champ N° 3.	juin.	410	—	7	2	—	—
	juillet.	380	—	—	23	—	—
	août.	163	185	—	19	38	—
	septemb.	27	93	153	7	21	5
De 410 larves en juin, 278 insectes ont survécu jusqu'en octobre.							

Ce tableau nous montre d'abord l'énorme importance des épidémies spontanées produites dans certains champs par les entomophytes. Dans les champs n°s 1 et 2 par exemple, la destruction des larves et des nymphes qui se sont développées des œufs pondus au printemps avait été presque complète : 97 à 99 0/0. Tous ces insectes ont-ils disparu du fait de l'infection ? Les données du tableau ne le montrent pas nettement ! Ainsi, sur les 203 individus disparus dans le champ n° 1, nous



n'avons retrouvé que 152 cadavres infectés et momifiés (93 larves, 47 nymphes et 12 imago), les 51 qui manquent ont donc pu succomber à d'autres causes ; mais le fait, très constant, que la quantité de larves momifiées trouvées en juillet est souvent supérieure à celle trouvée en août et toujours de beaucoup supérieure à celle trouvée en septembre, montre clairement que les momies tombent en poussière assez rapidement et ne peuvent plus être retrouvées. Il est donc certain que la grande majorité de celles qui manquent à l'appel ont succombé aussi à l'action des entomophytes.

La maladie commence donc en juin par quelques cas assez rares et continue à faire des victimes de plus en plus nombreuses jusqu'à la fin de septembre, et même jusqu'en octobre si la température est assez élevée pour permettre la germination des spores.

Comment doit-on s'expliquer cette croissance de l'épidémie ? On ne peut guère admettre que dans ce cas la maladie se propage par contagion entre individus sains et malades, — et cela pour plusieurs raisons. D'abord parce que les larves de cléonus sont peu mobiles et vivent séparées les unes des autres par des couches de terre plus ou moins épaisses, et surtout parce que les individus malades ne peuvent devenir contagieux que huit à dix jours après leur mort, quand le champignon aura produit des spores et des hyphasmates à la surface de leurs corps, c'est-à-dire au moment où les larves encore saines de la même génération seront déjà descendues un peu plus bas dans la terre. — Nous savons, en effet que les œufs du cléonus sont pondus à la surface du sol, et que les larves qui en proviennent s'enfoncent jusqu'à 30 à 40 centimètres de profondeur pour se transformer en nymphes. Elles ne refont jamais le chemin en sens inverse.

Enfin, les nymphes, complètement immobiles, ne peuvent être infectées que par les spores qu'elles trouvent sur place.

Il faut donc admettre que la grande majorité, sinon sous les insectes qui périssent dans la terre dans le courant d'une saison, sont infectés par les spores des entomophytes qui existaient dans la terre au moment de l'invasion. Dans le cas particulier qui nous préoccupe, c'est-à-dire dans le cas de la destruction des cléonus vivant à l'état de larves et de nymphes dans la terre par les entomophytes, il n'y a donc pas d'épidémie qui commencerait en juin par quelques cas assez rares et se développerait

ensuite d'elle-même par contagion, mais une endémie dont le développement dépend de la température du sol et l'intensité de la richesse de différents champs en entomophytes.

Certains champs, comme par exemple les champs n<sup>os</sup> 1 et 2 du tableau I, deviennent inhabitables pour les cléonus et pour certains autres insectes qui passent quelques mois de la belle saison dans la terre, parce qu'ils sont tellement riches en entomophytes que presque tous les insectes qui y entrent à l'état de larves s'infectent et périssent avant l'époque où ils pourraient en sortir à l'état parfait.

Il était alors intéressant d'étudier un grand nombre de champs au point de leur richesse en entomophytes. Nous savions que tous les champs de la région envahie par les cléonus n'étaient pas également infectés par les champignons; — dans le champ n<sup>o</sup> 3, par exemple, la proportion des insectes détruits ne dépassait pas 33 0/0 — et nous pensions qu'en tenant compte de la nature chimique et physique du sol et du sous-sol de tous les champs examinés, nous pouvions être amenés à trouver les causes de ces différences.

Nous avons examiné ainsi pendant trois étés successifs 317 champs dans 127 fermes situées dans différentes parties des gouvernements de Kieff et de Podolie, et nous avons pu noter les données suivantes :

Dans 30 0/0 environ de tous les champs examinés, les entomophytes s'opposent victorieusement à la multiplication des cléonus. La proportion des insectes contaminés dépasse 95 0/0, la quantité d'insectes qui sortiront indemnes de ces champs sera donc toujours inférieure à la quantité de ceux qui y sont entrés.

Dans tous les autres champs, au contraire, dans lesquels la proportion des insectes infectés est inférieure à 80 0/0, la quantité de cléonus continuera à augmenter chaque année.

L'examen chimique et physique de la nature du sol et du sous-sol de tous les champs étudié, ne nous a fourni aucune indication intéressante sur les causes probables des différences constatées dans le développement des entomophytes. Les terres arables du bassin du Dniéper présentent une très grande uniformité de composition, c'est partout du « tchernoziem » (terre noire très riche en humus) et les différences de perméabi-

lité du sous-sol semblent avoir très peu d'influence sur la fréquence de ces champignons.

Ce n'est qu'en étudiant l'histoire agricole de chaque champ, et notamment en établissant des comparaisons entre l'ancienneté de sa mise en culture pour les betteraves à sucre et la fréquence de ces cultures d'une part, et sa richesse en entomophytes d'autre part, que nous avons trouvé la cause probable de ces différences.

Les champs dans lesquels on cultivait des betteraves depuis 60 ans à des intervalles de 4 à 5 ans étaient toujours très riches en entomophytes; ceux, au contraire, dans lesquels on semait les betteraves pour la première fois, n'en contenaient que très peu. Dans les premiers cas, la destruction des insectes était presque complète, dans les derniers elle dépassait rarement 1 à 20/0.

Entre ces deux extrêmes il y avait, bien entendu, tous les intermédiaires, mais il y avait toujours une concordance tellement nette entre l'ancienneté ou la fréquence des cultures des betteraves dans un champ et sa richesse en entomophytes, que nous avons pu dresser un tableau indiquant la richesse en entomophytes de tous les champs dont il était possible de reconstituer l'histoire.

L'explication de cette concordance est extrêmement simple. Nous avons vu plus haut que les cléonus se concentrent chaque printemps sur les nouvelles plantations des betteraves, et que c'est presque exclusivement sur ces plantations qu'ils pondent leurs œufs. Or, les larves de cléonus s'infectent très facilement et constituent pour les entomophytes un milieu de culture et de multiplication très favorable. Chaque retour des betteraves et par conséquent aussi des insectes sur le même champ y amenait donc une nouvelle multiplication des entomophytes. Plus il y avait de ces retours périodiques et plus ils étaient rapprochés les uns des autres, plus riche aussi devenait le champ en spores de nos champignons, de sorte qu'après 10 à 12 de ces retours à 5 ans d'intervalle, le champ devenait inhabitable pour les insectes.

Comme l'intervalle de 5 ans est le plus court que l'on ait l'habitude de laisser dans ces régions entre deux cultures successives des betteraves, il faut donc, quand on laisse la nature

agir toute seule, au moins 50 à 60 ans pour arriver à ce résultat. Quand les périodes d'assolement sont plus longues, et elles sont souvent de 6 à 10 années, alors il faut un temps beaucoup plus long pour y arriver, et même on risque de n'y parvenir jamais, parce que les spores ou plutôt les conidies des entomophytes les plus répandues et les plus virulentes ne se conservent pas aussi bien et aussi longtemps que les endospores de certaines bactéries. Elles sont détruites non seulement par le temps, par le manque d'aliments appropriés et par le labourage qui, en retournant chaque année une couche de terre d'une certaine épaisseur, en expose une certaine quantité à l'air et au soleil, mais aussi par de nombreux parasites, champignons, anguillules et acariens, qui vivent à leurs dépens.

Ces pertes sont compensées en partie par le développement des entomophytes sur des larves d'autres insectes, des anisoplia, melolontha, agriotes, agrotis, qui vivent sur les céréales, de nombreuses espèces de curculionides qui vivent sur les papilionacées, de sorte que la quantité d'entomophytes qui peuplent tous les champs cultivés de cette région devrait augmenter avec le temps d'une façon très lente, mais à peu près constante, surtout dans la couche du sol qui n'est pas atteinte par les labours (15 à 40 centimètres de profondeur), et dans laquelle les entomophytes échappent mieux à l'action stérilisante de l'air, de la lumière, des variations atmosphériques et même aux atteintes de leurs parasites.

Nous connaissons des fermes dont tous les champs sont actuellement assez riches en entomophytes pour rendre la multiplication progressive des cléonus impossible. La destruction n'est jamais complète, mais la quantité de ceux qui échappent chaque année à l'infection est insuffisante pour mettre les plantations des betteraves en danger. On en trouve, au printemps, tout au plus 1 à 2 kilogrammes (7,000 à 15,000 individus) par hectare. Le développement des cléonus, des entomophytes et de leurs parasites est arrivé dans les champs de ces fermes à un état d'équilibre à peu près stable, qui ne pourra plus être troublé que par un changement des assolements ou des cultures.

On n'est en effet arrivé à ce résultat que dans des fermes bien administrées et cultivées de la même façon depuis à peu près 50 à 60 ans, c'est-à-dire depuis l'introduction de la culture des



betteraves à sucre dans ces contrées. Dans les fermes, au contraire, dans lesquelles il y avait des interruptions dans la culture des betteraves, dans lesquelles on a changé une ou plusieurs fois dans le même espace de temps le système d'assolement ou de culture, on trouve parfois des champs riches en entomophytes, mais on en trouve aussi où la proportion des insectes infectés ne dépasse pas 10 à 20 0/0.

De l'ensemble de ces observations, on peut conclure que les entomophytes peuvent infecter et faire périr dans la terre, dans le courant d'une saison, presque toutes les larves et nymphes d'une génération de cléonus, qu'il faut 50 à 60 ans de culture régulière, dans laquelle les betteraves reviennent sur les mêmes champs tous les 4 ou 5 ans, pour arriver à ce résultat, et enfin que les maladies causées par les entomophytes ne se propagent pas par contagion entre individus malades et sains, mais que la proportion des infectés dépend de la richesse du sol en spores de ces champignons au moment de l'invasion des insectes.

Ces observations nous ont permis aussi de déterminer d'avance la richesse d'un champ en entomophytes d'une façon beaucoup plus précise que nous n'aurions pu le faire au moyen d'un examen direct de la terre au microscope ou par des cultures, fait très important au point de vue de l'appréciation des résultats des expériences d'infection artificielle que nous avons à entreprendre.

*Les entomophytes qui infectent le charançon des betteraves.*

Nous avons trouvé jusqu'à présent 8 espèces d'entomophytes sur les larves, les nymphes et les imago du *cleonus punctiventris*. Quatre de ces espèces étaient déjà connues avant que nous ayons commencé nos recherches, ce sont :

*L'Oospora destructrix* Delacroix, découverte par M. Metchnikoff, (*Isaria destructor*) sur des larves d'anisoplia et de cléonus;

*La Soro-sporella uvella*. Giard, découverte par Sorokin (*Soro-sporella agrotidis*) et Krassilstchik (*Tarichium uvella*);

*L'Isaria farinosa* et le *Sporotrichum globuliferum*, espèces connues et décrites depuis fort longtemps.

Les quatre autres espèces sont nouvelles. Deux espèces de *Massospora*, une à spores orange échinulées, l'autre à spores rouges cloisonnées : une ascosporee que nous appellerons — sur

le conseil de M. Matruchot qui a bien voulu nous aider dans la classification de tous ces champignons, — *Stilbella pseudomortierella*, et un *Verticillium* à mycélium blanc et à conidies ovoïdes très analogues à celles de l'*Isaria densa*. Nous l'appellerons *V. Oxana*.

Trois de ces espèces, l'*Isaria*, le *Sporotrichum* et le *Verticillium*, infectent presque exclusivement les insectes parfaits, et, comme les cas de ces infections sont extrêmement rares et ne peuvent se produire que dans des conditions exceptionnelles, ces trois champignons présentent pour la pratique très peu d'intérêt. Nous les laisserons donc provisoirement de côté.

Les 5 autres espèces se développent exclusivement dans la terre et présentent aussi, au point de vue de leur fréquence et de leur intérêt pour l'agriculture, des différences considérables. Sur 100 individus morts d'infection, on trouve, en moyenne, 60 à 70 infectés par l'*Oospora*, 30 à 38 0/0 par la *Sorospora* et à peine 2 0/0 par les deux *Massospora* et la *Stilbella* ensemble.

Au point de vue de la façon dont ils les infectent et dont ils se développent dans les corps des insectes infectés, on peut diviser ces champignons en trois groupes, dont un sera formé par l'*Oospora*, l'*Isaria*, le *Sporotrichum* et le *Verticillium*, un autre par la *Sorospora* et les deux espèces de *Massospora*, le troisième par la *Stilbella*.

#### *Oospora destructrix.*

Comme type de l'infection du premier groupe, on peut prendre celle du hanneton vulgaire (*Melolontha vulgaris*) par l'*Isaria densa*, décrite par M. A. Giard. Pour ces quatre espèces d'entomophytes, l'infection se produit par la germination des conidies à la surface de la cuticule de l'insecte. Le ou les filaments de la conidie germée pénètrent à travers la cuticule dans la cavité générale du corps, s'y ramifient, et produisent de nouvelles conidies qui s'en détachent, sont entraînées par la circulation et par les leucocytes dont toutes les parties du corps, germent à leur tour, et remplissent bientôt le corps tout entier d'un feutrage très dense que l'on a appelé *scélérote*. Les conidies sont bien englobées par les leucocytes, mais n'en continuent pas moins à se multiplier.

On ne trouve plus alors à l'intérieur du corps de l'insecte que le revêtement chitineux du tube digestif; tout le reste, tous les

tissus ont été digérés et absorbés par les filaments du champignon. Le revêtement chitineux extérieur est intact au début et conserve la forme de l'insecte, mais bientôt, quand le sclérote se trouve dans des conditions de température et d'humidité convenables, il pousse à travers la cuticule des filaments mycéliens qui recouvrent tout le corps d'une toison très dense, et produisent aussitôt des conidies.

A une température de 18 à 20° et dans une humidité convenable, tout ce processus, depuis la contagion jusqu'à la production des conidies à la surface de la cuticule, peut durer 10 à 15 jours. Ensuite les filaments mycéliens s'agrègent par places et produisent des excroissances assez caractéristiques pour chaque espèce. Le mycélium du *Sporotrichum* forme des massues, celui de l'*Isaria* des filaments irréguliers, celui de l'*Oospora* des lanières plus ou moins larges et frangées au bout, analogues à celles de certains lichens. Sur tous ces filaments il se forme des conidies en quantité de plus en plus grande aux dépens des réserves du sclérote enfermé dans la cuticule. En fin de compte, tous les filaments du mycélium agrégé en hyphasmates et ceux du sclérote se transforment en spores, le tout devient extrêmement friable et tombe en poussière au moindre choc.

Pour l'*Oospora*, qui seule de ces 4 espèces nous intéresse au point de vue pratique, elle forme de beaux hyphasmates, surtout sur les nymphes des cleonus. On trouve dans la terre ces nymphes momifiées, garnies de leurs hyphasmates formés dans le courant d'un été, encore en bon état au printemps suivant ; on n'en trouve plus en automne ; elles ne durent donc pas plus d'une année.

Un sclérote frais est toujours une culture absolument pure du champignon qui l'a formé. On n'y découvre ni microbes étrangers, ni la moindre trace du tissu de l'insecte ; tout, les albuminoïdes et les graisses, a été digéré et absorbé par les filaments mycéliens. Un insecte infecté par un entomophyte n'est pas tué par une sécrétion toxique, mais simplement digéré.

En faisant macérer dans de l'eau physiologique une culture d'*Oospora* broyée, nous avons obtenu un liquide qui digère *in vitro* la gélatine, la fibrine et le blanc d'œuf cuit, avec formation de peptone, et qui oxyde la tyrosine. Le mycélium d'*Oospora* pro-

duit donc des diastases protéolytiques très énergiques et aussi de la tyrosinase.

*Culture sur des milieux nutritifs artificiels.* — Les spores d'Oospora, mélangées à de la terre végétale ordinaire, ne donnent pas de culture proprement dite.

Elles germent comme dans l'eau, et donnent quelques conidies, mais la quantité de spores qui en résulte n'est pas plus grande que celle qu'on a semée.

Elles ne se développent non plus ni sur des débris végétaux ou animaux, ni même sur des cadavres d'insectes. Dans les milieux non stériles, toutes les parcelles nutritives sont envahies par des microbes et des moisissures banales, qui se développent beaucoup plus facilement et rapidement que les entomophytes, et ne laissent plus de place pour ces dernières. Même quand on introduit dans de la terre non stérilisée une culture sur pomme de terre, déjà bien développée, elle est promptement envahie par des moisissures et des acariens, et ne tarde pas à disparaître. Par contre, sur des milieux nutritifs stériles, et notamment sur pomme de terre, l'Oospora donne des cultures aussi rapidement et aussi abondantes que quand elle se développe sur des insectes vivants.

A une température de 22° à 25°, on obtient sur pomme de terre des cultures bien sporulées en 15 à 20 jours. Placée dans du terreau stérilisé, modérément humide, une telle culture continue à se développer comme un sclérote placé dans les mêmes conditions, et donne en 2 à 3 mois une récolte de conidies beaucoup plus riche que si on avait laissé la culture continuer à se développer à l'air, dans un tube de verre ou dans une chambre humide.

#### *Sorospora uvella.*

Les entomophytes du deuxième groupe, formé par la *Sorospora* et les deux espèces de *Massospora*, se développent d'une tout autre façon dans le corps des insectes qu'ils ont infectés. Une larve ou une nymphe de *Cleonus*, tuée par un de ces champignons, se présente sous forme d'un sac rempli de granules rouges et jaunes. L'enveloppe de ce sac, la cuticule chitineuse transparente, garde bien la forme de l'insecte, mais elle devient



vite très fragile; quand on la déchire, les granules s'en échappent en poussière. Ces granules sont formées par des spores agglomérées sans trace de filaments mycéliens. Les spores sont rondes, beaucoup plus volumineuses que celles de l'*Oospora* et des *Isariées*, et pourvues d'une enveloppe beaucoup plus épaisse.

C'est dans cet état que l'on trouve des larves et des nymphes des *cleonus* infectées par la *Sorospora* dans la terre, en août et en septembre. dans les champs de betteraves, et c'est encore dans le même état qu'on les retrouve l'année suivante au printemps et en été. De quelle façon se fait l'infection, comment se développe le champignon une fois qu'il a pénétré dans le corps de l'insecte? Nous n'avons pas pu l'observer directement jusqu'à présent, parce que nous n'avons pas réussi à contaminer les insectes avec les spores contenues dans les sacs. Pourtant, nous avons obtenu des cultures de *Sorospora* sur pomme de terre, et nous avons constaté que ces spores se multiplient par division en deux à l'intérieur de leurs enveloppes. Quand la division est bien accomplie, la coque extérieure éclate, et les deux jeunes cellules qui en sortent, pourvues d'enveloppes minces, continuent de suite à se subdiviser en deux ou en quatre, tant qu'elles trouvent des matières nutritives à leur portée. Quand le milieu est épuisé ou devient inutilisable par suite de sa dessiccation, toutes ces jeunes cellules se recouvrent de l'épaisse coque caractéristique et deviennent des spores identiques à la spore initiale.

C'est de cette façon que, selon toute probabilité, les choses doivent se passer dans la cavité générale d'un insecte contaminé. Les spores se multiplient tant qu'elles trouvent du liquide et des tissus de l'organisme pour se nourrir. Quand tout est épuisé, quand les cellules remplissent complètement la cuticule de l'insecte, la multiplication s'arrête, toutes les cellules se transforment en spores à parois épaisses qui ne se développeront plus tant qu'elles resteront enfermées dans la cuticule. Nous ne savons pas encore quel sera le développement ultérieur de ces spores quand elles se trouveront disséminées dans la terre par suite de la destruction de la cuticule. Sur pomme de terre ou sur gélose, quand on maintient le milieu suffisamment longtemps à un degré d'humidité convenable, un certain nombre de jeunes cellules produisent des filaments mycéliens. Le mycélium apparaît plus rapidement (au bout de 15 à 20 jours), à une température

de 20 à 24°, qu'à la température de l'étuve à 35° (30 à 40 jours).

A cet état, la *Sorospora* n'est pas plus contagieuse qu'à l'état de spores.

C'est tout ce que nous avons pu observer jusqu'à présent sur le développement de la *Sorospora*. Des essais de culture et des expériences en cours nous en apprendront peut-être davantage dans le courant de cette année ou l'année prochaine, parce que l'évolution de ce champignon semble être relativement très lente — et le fait que les deux états de développement que nous connaissons déjà ne sont pas contagieux, tandis qu'il y a toujours un nombre considérable d'insectes contaminés dans la terre, nous fait supposer que ces recherches nous réservent des trouvailles intéressantes.

Les deux *Massopora* n'ont voulu pousser jusqu'à présent sur aucun milieu nutritif artificiel.

Au point de vue du rôle que la *Sorospora* peut jouer concurremment avec l'*Oospora*, dans la lutte avec le *cleonus*, il est important de noter que les cas d'infection par la *Sorospora* deviennent avec le temps de plus en plus fréquents. Ainsi, d'après les souvenirs de M. Metchnikoff, qui avait étudié les entomophytes de ces régions en 1880-83, on ne trouvait alors qu'un cas d'infection par la *Sorospora* pour 1,000 d'*Oospora*. Aujourd'hui, cette proportion est de 1 à 3 en moyenne, et il y a des régions où la sorosporose est déjà plus fréquente que l'oosporose. La résistance beaucoup plus grande des spores de la *Sorospora*, et peut-être aussi la lenteur de son évolution nous expliquent très bien ce phénomène. et il est certain que, si rien ne vient troubler l'état de choses qui s'établit naturellement, la *Sorospora* finira peut-être par prendre le dessus sur l'*Oospora*, et deviendra probablement un ennemi plus redoutable pour le *cleonus* que ne l'est actuellement cette dernière.

#### *Stilbella pseudomortierella.*

Les cas d'infection produits par cette espèce sont encore extrêmement rares.

Nous l'avons trouvé dans la proportion de 1 cas pour 1,000 produits par tous les autres entomophytes ensemble.

Elle est pourtant bien intéressante et peut devenir bien

importante, parce qu'elle produit des *asques* à l'extérieur du sclérote très dur et très résistant, et à l'extérieur de la cuticule de l'insecte momifié des conidies très contagieuses.

La *Stilbella* se laisse assez facilement cultiver sur pomme de terre, mais se développe lentement et donne des cultures assez maigres. Jusqu'à présent, nous n'avons pas encore pu obtenir des *asques* sur des milieux artificiels.

Tant qu'on n'aura pas trouvé des milieux de culture dans lesquels ce champignon pourra donner plus rapidement des cultures abondantes, on ne pourra guère s'en servir dans la pratique.

#### ESSAIS D'APPLICATION EN GRAND DES CULTURES ARTIFICIELLES D'OOSPORA A LA DESTRUCTION DES CLEONUS

De tous les entomophytes du charançon des betteraves, c'est l'espèce découverte par M. Metchnikoff, l'*Oospora destructrix* qui semblait devoir donner dans la pratique, le plus facilement, les résultats les plus appréciables, parce que, étant presque partout plus fréquente, elle semblait trouver dans la nature des conditions plus favorables à son développement que tous les autres entomophytes que nous venons de passer en revue, et aussi parce qu'elle pouvait donner, en culture artificielle, rapidement une récolte de beaucoup la plus abondante.

Tous nos essais en grand n'avaient donc été faites jusqu'à présent qu'avec des cultures d'oospora.

D'après ce que nous avons vu plus haut sur les conditions d'infection du *cleonus* dans la nature, on ne peut atteindre ces insectes à l'aide des cultures d'entomophytes qu'au moment où ils se trouvent dans la terre des champs de betteraves à l'état de larves et de nymphes. Nous avons vu aussi qu'il ne fallait pas compter beaucoup sur la propagation de la maladie par contagion entre individus sains et malades. Pour obtenir un effet appréciable, il était donc nécessaire d'introduire dans la terre une quantité suffisante de cultures pathogènes pour que la majorité de larves et de nymphes puissent les rencontrer et s'infecter. Nous pensions que cette quantité ne pourrait par être inférieure à quelques kilogrammes par hectare.

Pour produire des cultures d'*Oospora* en grandes quantités,

nous avons pensé à utiliser tout d'abord les grandes quantités de *cleonus* que l'on ramasse au printemps. On en ramasse plusieurs mètres cubes dans chaque ferme, et il nous semblait facile de contaminer ces masses d'insectes à l'état vivant et de les mélanger ensuite avec de la terre pour provoquer le développement des sclérotés et des hyphasmates.

En procédant ainsi, nous espérions pouvoir produire de grandes quantités de cultures d'*Oospora* d'une façon relativement très simple en économisant les frais et les nombreuses manipulations que nécessite la stérilisation des milieux de culture. Ce procédé avait aussi le grand avantage d'être à la por-

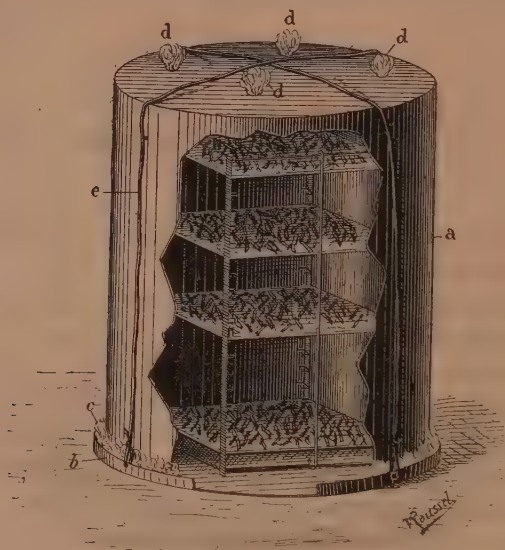


Fig. 1.

tée de tous les agriculteurs et, s'il avait réussi, il aurait pu donner rapidement d'excellents résultats.

Malheureusement, notre espoir avait été vite déçu.

L'infection en masse des *cleonus* a très bien réussi, mais, quand on a mélangé les cadavres des insectes avec de la terre, il s'est développé sur ces cadavres une telle quantité d'acariens, si friands de nos cultures d'*Oospora*, que les conidies qui commençaient à se former et les sclérotés ont complètement disparu en quelques semaines.

Nous avons bien vite acquis la certitude que ces acariens ne



provenaient pas seulement de la terre, mais des *cleonus* eux-mêmes qu'ils infectaient en parasites pendant la vie de ces derniers; ils se multipliaient avec une rapidité étonnante sur leurs cadavres. La stérilisation de la terre n'aurait donc pas pu remédier à cet inconvénient, et nous avons été obligés d'abandonner provisoirement ce système de culture pour des cultures

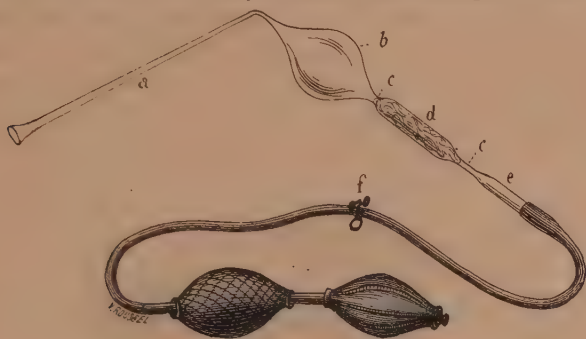


Fig. 2.

sur des milieux nutritifs artificiels stérilisés, et notamment pour des cultures sur pomme de terre.

Un appareil très simple nous a permis d'en produire beaucoup d'une façon relativement très économique.

Comme le montre la figure 1, cet appareil se compose d'une boîte en fer-blanc ou en tôle de zinc, à l'intérieur de laquelle on place une étagère garnie de plaques de verre. Sur ces plaques on dispose des pommes de terre coupées en petits morceaux. La boîte, garnie de coton aux jointures, est stérilisée à l'autoclave. Après stérilisation, on ensemece l'*Oospora* sur les pommes de terre en insufflant des spores dans l'appareil par les ouvertures *d* avec la pipette fig. 2, dont le renflement (*b*) avait été préalablement à moitié rempli de spores par aspiration.

Après 15 à 20 jours à une température de 20° à 25°, quand l'*oospora* a déjà formé des conidies, on détache les cultures des plaques de verre et on les place dans des caisses en bois sur plusieurs couches superposées, en séparant chaque couche de culture par une couche de terreau stérilisé avec du sulfure de carbone. Placée dans ces conditions, l'*Oospora* continue à se développer et, au bout de 4 à 5 mois, on obtient une terre très riche en spores.

Le prix de revient de cette terre chargée de spores est de

2 francs le kilogr. environ, et nous pensons que si on la distribue à raison de 10 kilogr. par hectare, on obtiendra déjà des résultats très appréciables.

On peut s'en rendre compte par l'expérience dont les résultats sont résumés dans le tableau II.

Cette première expérience en grand avait été faite l'année dernière (1902) dans le domaine de Sencla (Russie, gouv. de

TABLEAU II.

Quantité de muscardine.	Numéro de la prise.	Larves vivantes du cleonus.	Chrysalides vivantes.	Insectes parfaits vivants.	Insectes vivants en tout.	Insectes contaminés par oospores
Parcelle n° 1 non traitée.	2	7	7	7	21	2
	3	4	15	14	33	0
	4	5	12	9	26	1
	5	2	8	11	21	0
Parcelle n° 2 avec 4 kil. d'oospores par hect.	2	0	18	10	28	4
	3	8	0	21	32	9
	4	2	7	9	18	1
	5	3	9	15	27	3
Parcelle n° 3 avec 2 kil. par hect.	2	1	4	12	17	3
	3	2	17	31	50	3
	4	1	15	8	24	3
	5	1	13	18	32	1
Parcelle n° 4 avec 3 kil. par hect.	2	4	4	6	12	9
	3	2	9	2	12	0
	4	0	9	13	22	2
	5	0	10	22	32	1
Parcelle n° 5 avec 5 kigr. par hect.	2	1	15	57	73	25
	3	4	9	15	23	14
	4	0	7	15	22	9
	5	0	4	28	32	2
Parcelle n° 6 avec 10 kil. par hect.	2	0	7	17	24	22
	3	0	11	41	22	14
	4	0	10	19	29	14
	5	0	6	35	41	20
	4	1	13	25	39	9
	5	0	5	27	32	3

Kieff) appartenant à M. le comte Léon Bobrinskoy, qui a bien voulu nous prêter son concours le plus empressé.

Nous avons traité :

1 <sup>o</sup>	4	hectares d'un champ de betteraves avec 1 kilog. de culture par hectare.
2 <sup>o</sup>	4	hectares avec 2 kilog. de culture par hectare.
3 <sup>o</sup>	3	— — — 3 — — —
4 <sup>o</sup>	2	— — — 5 — — —
5 <sup>o</sup>	1	— — — 10 — — —

La parcelle témoin (non traitée) était de 7 hectares.

Nous avons choisi pour cette expérience un champ qui, d'après nos prévisions, devait être naturellement encore très pauvre en entomophytes, c'est-à-dire un champ qui ne devait recevoir des betteraves que pour la 2<sup>e</sup> fois.

La culture avait été distribuée à l'aide d'un semoir combiné en même temps que les graines de betteraves; elle se trouvait donc localisée dans des sillons espacés de 45 cent. l'un de l'autre.

Nos prévisions se sont trouvées assez bien réalisées. Dans la parcelle non traitée, l'infection spontanée n'a atteint que 2 0/0. Dans les parcelles traitées, la proportion des insectes infectés allait en augmentant assez régulièrement avec la quantité de culture distribuée. Dans certaines parties du champ, la proportion des infectés était de 50 0/0.

Nous aurions certainement obtenu des différences beaucoup plus sensibles entre les différentes parcelles si, au lieu de semer l'oospora en sillons avec les graines, nous l'avions distribuée à la volée au moment des labours.

C'est de cette façon que nous avons procédé au printemps de cette année en distribuant environ 10 kilog de cultures d'oospora par hectare sur la moitié d'un champ de betteraves de 47 hectares.

Les résultats de cet essai ne seront appréciables qu'en octobre.

Mais, en admettant qu'une introduction dans la terre de 10 kilogr. de nos cultures par hectare n'augmentera pas plus de 30 0/0 la proportion des insectes contaminés, le traitement serait déjà très profitable, non seulement par ses résultats immédiats en détruisant un certain nombre de larves qui vivent aux dépens des racines, mais surtout parce qu'il enrichit le champ en



entomophytes autant que 5 ou 6 passages de betteraves.

L'introduction dans la terre d'une quantité convenable de cultures artificielles d'oospora produira donc dans un champ le même effet que 25 à 30 années de culture.

La généralisation de ce procédé dans toute la région envahie actuellement par les *cleonus* amènerait certainement une diminution notable de la quantité de ces insectes dans l'espace de 5 à 6 ans, c'est-à-dire quand tous les champs destinés à la culture des betteraves auraient reçu le traitement que nous venons d'indiquer.

---

#### ERRATA

Dans l'article de M. Marino, intitulé : « Non-existence des neutrophiles d'Ehrlich » et inséré dans ce volume, faire les corrections suivantes :

Page 357, ligne 9, lire *acides* au lieu de *avides*.

Page 359, ligne 6, supprimer *certaines*.

Page 362, ligne 30, lire d'*Holothuria* au lieu d'*Holotheuria*.

Page 363, ligne 3, lire *pour les couleurs basiques (basophiles)*, au lieu de *pour les couleurs* (basiques basophiles).

Page 363, ligne 30, lire *retenaient toujours les couleurs acides* au lieu de *retenaient toujours les couleurs décrites par*.

---

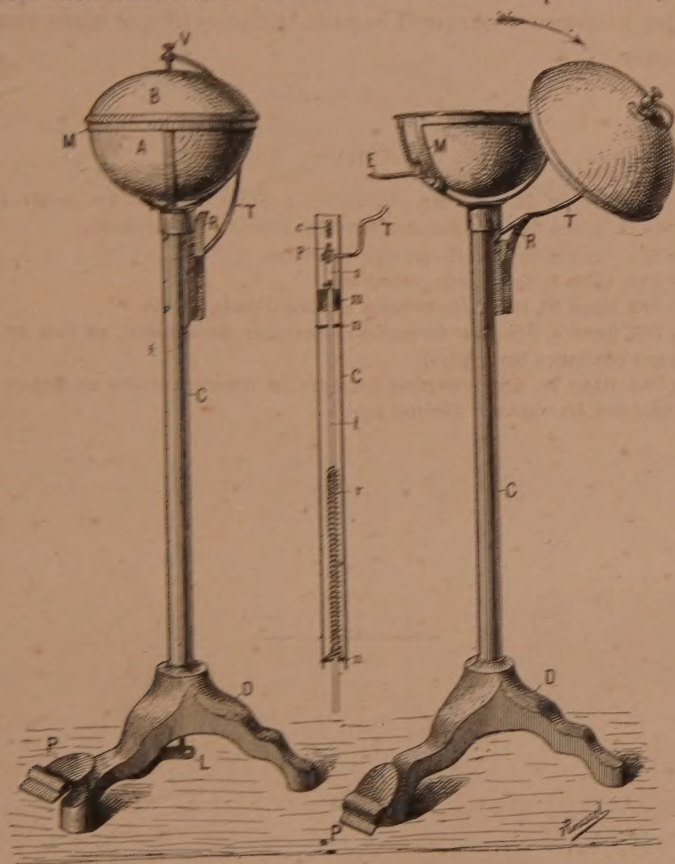


# CRACHOIR STÉRILISABLE A FERMETURE AUTOMATIQUE

PAR M. ALEXANDRE FOURNIER.

Aide à l'Institut Pasteur.

Les hygiénistes qui se sont occupés de la propagation de la tuberculose par les crachats ont toujours cherché un système de crachoir facilement stérilisable. La solution du problème, sim-



ple au premier abord, devenait très difficile dans son application; le système adopté devait non seulement être irréprochable au point de vue hygiénique, mais étant mis à l'usage du public, il devait se présenter d'une façon agréable à la vue.

La première idée fut d'employer un récipient à double fond dans lequel les crachats venaient se perdre au milieu d'un liquide antiseptique.

D'autres constructeurs adoptèrent un couvercle articulé avec le corps du crachoir, au moyen d'une charnière. Ces deux systèmes se sont montré défectueux dans leur usage.

Nous venons de construire un modèle, qui sous le rapport hygiénique et esthétique paraît ne rien laisser à désirer. L'appareil se compose d'une cuvette A en faïence émaillée. Ce récipient est soutenu dans une monture M, en acier nickelé, supportée par une colonne C, en même métal. La cuvette est fermée par un couvercle métallique B, pouvant s'ouvrir au moyen d'un mécanisme simple actionné par une pédale P.

Quand on fait une légère pression avec le pied, sur la pédale P, celle-ci actionne un levier L qui soulève une tige *t* dissimulée dans la colonne C. Cette tige *t* porte à son extrémité la pièce T, qui soutient le couvercle B.

A la base de la pièce T se trouve une roue dentée *p* qui engrène avec une crémaillère fixe *c*, lorsque la tige *t* arrive au haut de sa course. La roue dentée tourne alors autour de son axe et la pièce T est rejetée sur le côté de l'appareil, entraînant avec elle le couvercle, ainsi que le montre la figure. A ce moment la cuvette est complètement découverte, le couvercle B étant tout à fait séparé du corps du crachoir.

Lorsqu'on fait cesser la pression sur la pédale P, le ressort R repousse la pièce T vers sa position primitive, tandis que le ressort *r*, dissimulé dans la colonne C, attire la tige *t* vers le sol ; le couvercle reprend alors sa première position et le crachoir se trouve complètement fermé.

Le nettoyage et la désinfection du crachoir se font très facilement : deux poignées E placées des deux côtés de la cuvette permettent de l'enlever aisément de sa monture métallique. Le couvercle B peut être lui-même désarticulé, grâce à la vis V, afin d'être nettoyé et stérilisé.

Cet appareil paraît résoudre le problème, en répondant à toutes ses données hygiéniques et esthétiques.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

Sceaux. — Imprimerie Charaire.